THESIS

MUNICH

1966

Zur Frage der Existenz von Phytoöstrogenen

(Pflanzeninhaltsstoffe mit östrogener Wirkung)

MARIE ANNA ROTHHOLZ

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Vorstand: Professor Dr.med.W.BÜNGELER

ZUR FRAGE DER EXISTENZ VON PHYTOÖSTROGENEN

(Pflanzeninhaltsstoffe mit östrogener Wirkung)

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin

verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt

von

Marie Anna Rothholz

München 1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153305_0054

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W.BÜNGELER

Dekan: Prof. Dr. R.ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.66

Herrn Professor Dr.W.BÜNGELER danke ich
für die Übernahme des Referates.

Die Arbeit wurde ausgeführt in der Chemischen
Abteilung des Pathologischen Institutes der
Universität München.
Herrn Dr.phil. Dr.med. H.BAYERLE, Leiter der
Abteilung, danke ich für die Überlassung des
Themas und die Anregungen in allen Stadien
der Arbeit.

Herrn Dr.rer.nat. F.GRANDEL danke ich für die
Überlassung der Versuchspräparate.

Fräulein M.SCHNEIDER (MTA) danke ich für die
Mithilfe im Laboratorium.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite:
Literaturbesprechung der bisherigen Untersuchungsergebnisse	1
Eigene experimentelle Untersuchungen	48
Diskussion	76
Zusammenfassung	79
Literaturverzeichnis	81
Lebenslauf	87

LITERATURBESPRECHUNG DER BISHERIGEN UNTERSUCHUNGS-ERGEBNISSE

Berichte über östrogen wirksame Substanzen pflanzlicher Herkunft liegen in großer Fülle vor. Die Berichte reichen dabei vom einfachen Nachweis der Effekte bis zur Erklärung scheinbarer oder auch tatsächlicher pathologischer Veränderungen bei Mensch und Tier.

Die Aufgabe der vorliegenden Dissertation besteht in einer Zusammenstellung dieser Berichte, sowie in dem Versuch einer kritischen Beurteilung und Bewertung des vorliegenden Materials und schließlich in der Durchführung eigener Untersuchungen an Substanzen, die in der Literatur als wirksam bezeichnet werden.

Es ist zweckmäßig, zunächst einige Begriffe zu definieren. Die Stoffe, von denen hier die Rede sein wird, heißen Phytoöstrogene. Darunter verstehen wir Stoffe pflanzlicher Herkunft mit östrogener Wirkung auf den tierischen und menschlichen Organismus, die sich chemisch von den im Tierreich vorkommenden weiblichen Sexualhormonen - nur diese sind als Östrogene definiert - unterscheiden. Sie gehören den verschiedensten chemischen Stoffklassen an. Man könnte sie in drei grosse Gruppen einteilen:

1. Phytoöstrogene mit Steroid-Struktur
2. Phytoöstrogene mit anderer bekannter Struktur
3. Phytoöstrogene mit unbekannter chemischer Struktur.

Im Schrifttum der zwanziger Jahre war die Bezeichnung Thelykinine gebräuchlich. Man verstand darunter allgemein alle östrogen wirksamen Stoffe, unabhängig von

ihrer tierischen oder pflanzlichen Herkunft. Man differenzierte dann lediglich, indem man von "tierischen" und "pflanzlichen" Thelykininen sprach. Diese Bezeichnung hatte damals ihre Berechtigung, da man noch erwog, ob nicht ein einheitlicher Stoff der gesamten belebten Natur vorliegen könnte. Für das aus pflanzlichem Material stammende Agens wurde dann der Name "Tokokinin" vorgeschlagen, der sich jedoch nicht durchsetzte. Unter pflanzlichem Thelykinin oder Tokokinin verstand man also sowohl Phytoöstrogene als auch Phytohormone. Phytohormone sind jedoch nach heutiger Definition spezifische Wirkstoffe, von der Pflanze erzeugt und für die Pflanze bestimmt. Phytoöstrogene sind also prinzipiell keine Phytohormone; eine gelegentliche Übereinstimmung der Wirkung bei Mensch und Tier demnach nur zufällig. Dies zu betonen ist nicht nur wegen der obigen Überschneidung wichtig, sondern weil die Begriffe immer wieder falsch gebraucht werden. Die grundsätzliche Existenz von Phytoöstrogenen wird heute als selbstverständlich hingestellt, ohne aber in ihrer Erforschung zu übereinstimmenden Ergebnissen gekommen zu sein, dabei hat das allgemeine Interesse an diesen Stoffen in den letzten Jahren ständig zugenommen. Nur wenige der östrogen wirksamen Stoffe sind chemisch definiert. Worin die Fragwürdigkeiten bestehen, will ich versuchen klarzustellen. Ich gebe in einem ersten Kapitel einen Überblick über die Entwicklung und den gegenwärtigen Stand der Kenntnisse des Problems.

I

Es werden hier ausschließlich Stoffe pflanzlicher Herkunft besprochen, denen östrogene Wirksamkeit zugesprochen wird.

Die erste größere Arbeit veröffentlichten LOEWE und Mitarb. 1926[1]. Diese Autoren berichten, daß die Anregung zu ihren Untersuchungen von botanischer Seite kam. LOEWE und FAURE[2] hatten damals gerade das "Thelykinin" im Blut weiblicher Tiere nachgewiesen, was bei den Botanikern die Frage auslöste, ob nicht auch für das Pflanzenreich ein humerales Kennzeichen der Geschlechtsprägung ausfindig gemacht werden könne. Es wurde die Frage erörtert, ob die einzelnen Feststellungen auf ein allgemeines weibliches Prägungsprinzip in der gesamten belebten Natur oder aber auf unspezifische Stoffe von einer gewissen, mehr zufälligen Gemeinsamkeit der Wirkung mit dem tierischen Sexualhormon hindeuten würde.

Das Pflanzenmaterial wurde in großen Mengen verarbeitet, ausgehend von der Vorstellung, daß in den Trägergeweben der "inkretorischen" Thelykininerzeugung der Pflanze der Größenordnung nach ähnliche Thelykininmengen enthalten sein könnten wie in den thelykininreichsten Teilen des Eierstocks, also rund 1000 Mäuse-Einheiten/kg Feuchtsubstanz. Die Verarbeitung der frisch geernteten pflanzlichen Ausgangsstoffe wurde in weitgehender Anlehnung an die Erfahrung bei der Isolierung des Thelykinins aus tierischem Ausgangsstoff durchgeführt. Die Isolierung erfolgte entweder durch Feuchtextraktion frisch geernteter Pflanzen oder durch Extraktion des vorgetrockneten Materials. Zur Feuchtextraktion dienten

Äthanol und Methanol. Die Trocknung erfolgte in großen gelüfteten Wärmeschränken bei etwa 50°C; das Trockenmaterial wurde dann mit Äther ausgezogen. Bei der Verarbeitung pflanzlicher Ausgangsstoffe mit organischen Extraktionsmitteln war von vorneherein mit einer viel größeren Ausbeute an Ballaststoffen zu rechnen als bei entsprechender Verarbeitung tierischer Organe. Die größere Mannigfaltigkeit der in organischen Lösungsmitteln löslichen Pflanzenstoffe brachte die Gefahr toxischer Beimengungen von Terpenen, Alkaloiden o.ä. mit sich. Aber auch abgesehen von diesen besonderen Gefahren war die größere Massenbelastung mit rein volumenmäßig störenden Ballaststoffen in Rechnung zu ziehen. Es war also erforderlich, das Volumen der mit dem ersten Extraktionsmittel gewonnenen Rohextrakte durch weitere Fraktionierungsmaßnahmen zu verringern. Auch dies geschah in Anlehnung an die Verarbeitungsweise tierischen Materials. Wechselweise Lösung und Fällung mit den verschiedensten organischen Lösungsmitteln führte dabei zu einem gewissen Erfolg. So wurden mehr oder weniger fraktionierte, aber naturgemäß immer noch recht rohe Extrakte gewonnen. Ihre Lösungen in den organischen Lösungsmitteln wurden gut entwässert, dann das Lösungsmittel verjagt und der Extraktionsrückstand, in passendem Volumen Olivenöl gelöst, zur subkutanen Injektion an die Testtiere verwendet. Als Test diente die seinerzeit schon häufig angewendete Methode der Scheidenabstrichuntersuchung nach ALLEN-DOISY, auf den noch näher eingegangen wird. Die Versuchsergebnisse versetzten die Autoren in Optimismus; sie sahen ihre Theorien bestätigt, weil sie in allen untersuchten Pflanzen aus recht verschiedenen Familien, in Salix caprea, Nuphar luteum, Althaea rosea und Impatiens parviflora Thelyki-

nine gefunden zu haben glaubten. Daraus schloß man auf eine allgemeine Verbreitung der Thelykinine im Pflanzenreich. Die ausgiebigste Quelle solcher pflanzlichen Thelykinine seien Blüten weiblicher Weidenkätzchen. Ferner wurde Thelykinin in der roh isolierten Samenanlage qualitativ nachgewiesen. Die isolierte Narbe der Weidenblüte enthalte bedeutend weniger Thelykinin als die Gesamtblüte (weniger als 14 M.E./kg Feuchtsubstanz). In Stengeln oder von Blüten befreitem Kraut blühender Pflanzen (Impatiens parviflora bzw. Althaea rosea) seien ebenfalls Thelykinine nachzuweisen, jedoch im Vergleich zu dem Gehalt der analysierten Blüte nur in verschwindender Menge (weniger als 1 M.E./kg Feuchtsubstanz; die M.E. ist dabei definiert als diejenige kleinste Menge einer Substanz, die gerade noch ein Schollenstadium hervorzurufen vermag). Beurteilt man diese Ergebnisse rückschauend im Zusammenhang, so müßte man annehmen, daß östrogen wirksame Stoffe in Pflanzen ubiquitär vorkommen. Es könnte aber auch die Vermutung entstehen, daß die Untersucher unter dem Eindruck der neu entdeckten Effekte an die Nachweismethode keine zu hohen Anforderungen stellten oder die Fehlermöglichkeiten nicht hinreichend in Erwägung zogen.

Als einen augenfälligen Unterschied der Brunstwirkung zwischen tierischen und pflanzlichen Thelykininen im ALLEN-DOISY-Test wurde die wesentlich anders verlaufende Brunstkurve bei Anwendung pflanzlichen Thelykinins angesehen. Während das tierische Thelykinin, in nicht zu großer Dosis einmal gegeben, seinen Schuppungserfolg in der Zählkurve im Bild einer kurzfristigen , aber steilen Zacke wiedergibt, die am fünften Tage nach der Hormondarreichung bereits wieder zum normalen niedrigen Niveau

des Diestrums zurückgekehrt ist, lassen sich die Auswirkungen einer gleichfalls einmalig gespritzten pflanzlichen Thelykiningabe über mehrere Wochen hin wiederfinden. Dabei braucht der Schuppungserfolg zu keinem Zeitpunkt der offensichtlichen Desquamationswirkung maximal zu sein. Dieses Phänomen führten die Autoren auf einen schwankenden Thelykininspiegel im Blut zurück, da eine Analyse dieser Schwankungen von FRANK und GOLDBERG[3] einen gewissen Gleichlauf der Brunstvorgänge in der Vaginalwand mit dem Thelykininblutspiegel sehr wahrscheinlich gemacht hatte. Diese Konzentrationsschwankung im Blut suchte man wie folgt zu erklären:

a) Verschieden schnelle Resorption des Wirkstoffes aus der Öl-Lösung in die umspülenden Körperflüssigkeiten, bedingt durch ungleich größere Mengen und andere Beschaffenheit von Begleitsubstanzen im Pflanzenmaterial gegenüber tierischem. Die Pflanzenöle, vor allem aber die pflanzlichen Terpene, Harzsubstanzen und dergleichen, schienen weit mehr als die im tierischen Ausgangsmaterial mitextrahierten Fette und Lipoide befähigt, die Löslichkeit des Thelykinins im öligen Lösungsmittel zu erhöhen, seine Verteilung zwischen Öl und wäßrigen Körperflüssigkeiten zu Gunsten des Öls zu verschieben.

b) Ein im Pflanzenextrakt enthaltender Wirkstoff, der selbst keine Thelykininwirkung besäße, könnte womöglich den Anstoß zur Entstehung einer thelykininwirksamen Substanz aus irgendeiner unbekannten Quelle des Organismus geben. Das sei freilich recht unwahrscheinlich, denn man kannte kein Organ, das in einem ovarektomierten Organismus Stoffe vom Wirkungstyp des weiblichen Gonadeninkrets

zu erzeugen vermochte. Es bliebe aber noch die Möglichkeit, daß die pflanzlichen Wirkstoffe eine Art Prohormon seien, das erst nach einem gewissen Aufenthalt im Organismus zum Thelykinin aktiviert würde.

Weitere Besonderheiten gegenüber tierischen Thelykininzubereitungen traten nicht zutage. Löslichkeit und Haltbarkeit wurden nicht wesentlich verschieden gefunden. Selbst nach einer Aufbewahrungsfrist von drei Monaten wurde zwar geringere Thelykininaktivität in den getrockneten Blüten gefunden, doch war sie keinesfalls ganz verschwunden.

Die oben genannten Autoren haben seinerzeit auch die recht interessante Frage nach einer Spezifität des pflanzlichen Thelykinins zur Diskussion gestellt, die Frage, ob die vorliegenden Feststellungen auf ein allgemeines weibliches Prägungsprinzip in der gesamten belebten Natur hindeuteten oder aber unspezifische Stoffe von einer gewissen, mehr zufälligen Wirkungsgemeinschaft mit dem tierischen Sexualhormon aufdeckten.

Zugunsten einer Geschlechtsspezifität konnten die Autoren anführen:

1. Die weibliche Blüte habe sich als ergiebigste Fundstätte des pflanzlichen Wirkstoffs, innerhalb der Blüte kopulative Organe wie Narbe vergleichsweise als wirkstoffarm herausgestellt. Die Autoren weisen aber andererseits selbst darauf hin, daß ihre Untersuchungen nicht ausreichend seien, daß Vergleichsanalysen vegetativer Pflanzenteile, sowie Gehaltsbestimmungen männlicher Pflanzen von diözischen Arten fehlten und ähnliches mehr.

2. Die Gemeinsamkeit mit den tierischen Thelykininen ginge über das Wirkungsmerkmal des östrogenen Effekts an der Vagina des ovarektomierten Nagerweibchens hinaus (Uterusvergrößerung).
Gegen eine Spezifität haben die Autoren sich selbst Einwände gebracht: z.B., daß in den Fruchtknoten von Nuphar luteum (Teichrose), also einem rein generativen Organ, welche den Ausgangspunkt für die gesamten Untersuchungen bildeten, kaum mehr Thelykinin zu finden sei als in den Narben von Salix (Weide), einem bloßen Kopulationsorgan. Oder: auch in der Hefe seien sehr beachtliche Thelykininmengen nachzuweisen, sowie in der Kartoffel, einem Speicherorgan. Ein Thelykininbefund in einem derartigen Organ, das mit Generationsaufgaben so wenig in Beziehung zu setzen sei, spräche stark gegen die Geschlechtshormonnaturder pflanzlichen Thelykinine.

Wenn man die Arbeit von LOEWE und Mitarbeiter rückblickend betrachtet, ergibt sich als Resümee, daß ohne ausreichende Basis gesicherter Versuchsergebnisse Theorien aufgestellt wurden, deren Wert nur darin bestand, Anregungen für weitere Forschungsarbeit zu geben. Der Begriff des Thelykinins mußte aufgegeben werden (zumindest der Name), die Spezifität der Erscheinung war in Frage gestellt. Es sind dann auch in der Folgezeit fortlaufend zur gleichen Problemstellung Arbeiten erschienen, teils als Ausdruck für das steigende Interesse an biochemischen Problemen überhaupt, teils weil die Kenntnisse tierischer Steroidhormone in jenen Jahren sich vertieften und es nahe lag, nach biochemischen Parallelen in der Pflanzenphysiologie zu suchen.

1931 erschien ein Bericht von MUCH und Mitarbeiter[4], wonach mit Auszügen aus Holunder-, Linden- und Nessel-

blüten bei infantilen und ovarektomierten weiblichen Mäusen Schollenstadien hervorgerufen wurden. Die Untersucher fanden, daß sich das Schollenstadium langsamer einstellte und länger anhielt als bei Mäusen, die gleichzeitig mit tierischen Hormonpräparaten behandelt wurden. Die einfachen, aus dem Blütenmaterial hergestellten Preßsäfte waren unwirksam. Deshalb verwendete man Alkohol, Äther und Benzol als Extraktionsmittel und injizierte die Konzentrate in Olivenölmischung den Mäusen.
Es ist bemerkenswert, daß sich MUCH und Mitarb. von der Vorstellung eines allgemeinen weiblichen Prägungsprinzips in der gesamten belebten Natur lösen. Sie verweisen auf die Entdeckung östrogener Wirksamkeit in der Kartoffelknolle und in der Hefe.

Von besonderer Bedeutung erwies sich eine Untersuchung von BUTENANDT und JACOBI[5]. Es gelang diesen Autoren aus 50 kg Palmkernrückständen 18 mg einer kristallisierenden Substanz zu isolieren, die sich nach chemischer Analyse als Östron erwies und im ALLEN-DOISY-Test positiv war. Die Auswirkung dieser beachtlichen Untersuchung war zweifach. Erstens wurden nunmehr vorwiegend die tatsächlichen oder scheinbaren östrogenen Wirkungen von Pflanzen auf das Östron zurückgeführt, zweitens wurde die Arbeitsweise der genannten Autoren zum Vorbild und zur Standardmethode bei Isolierungsversuchen. Damit war aber eine Richtung eingeschlagen, die, wie sich zeigen sollte, zu einseitig war. Es ist übrigens bemerkenswert, daß die Namen BUTENANDTS und seiner Mitarbeiter in der inzwischen außerordentlich angewachsenen Literatur nicht weiter erschienen. Der Begriff Thelykinin hatte jedenfalls seine Bedeutung verloren oder eingebüßt.

SKARŻYŃSKI[6] untersuchte zur selben Zeit Weidenkätzchen und isolierte aus 65 kg Blütenmaterial 7,5 mg Kristalle, die dem Östriol, das er aus dem Urin von Frauen gewann, in den chemischen Eigenschaften ähnlich war, aber im ALLEN-DOISY-Test nur ein Viertel der Wirksamkeit aufwies.

Als VATNA[7] 1940 über eine östrogene Substanz aus der Knolle der siamesischen Schlingpflanze Butea superba berichtete, sah sich eine Forschergruppe, SCHOELLER und Mitarb.[8], veranlaßt, ihre länger zurückliegenden Beobachtungen zu veröffentlichen. Die Untersuchungen dieser Forscher begannen mit der Prüfung eines "siamesischen Aphrodisiakums" aus der Pflanze Butea superba im ALLEN-DOISY-Test. Sie stellten hierbei östrogene Wirksamkeit fest und fanden ein besonders günstiges Wirkungsverhältnis von subkutaner zu peroraler Applikation. Mit der Schlundsonde benötigten sie nur das Doppelte der subkutan notwendigen Dosis. Es wurden Mengen bis zu 180 000 Ratten-Einheiten /kg Knolle festgestellt, eine Ratten-Einheit entsprach 0,83 Gamma Östron. Nach ihrer Rechnung konnten die Knollen Östrogengehalte von 150 mg/kg erreichen! Die Substanz wurde in ihren Wirkungen mit "Follikelhormon" verglichen und in folgenden Punkten kam man zu übereinstimmenden Ergebnissen (SCHOELLER und Mitarb.[8]):

1. Aufbau von Vagina, Uterus und Mamma bei infantilen oder ovarektomierten Ratten und Kaninchen.
2. Umwandlung der künstlichen, durch Buteawirkstoff proliferierten Uterusschleimhaut des Kaninchens in die Sekretionsphase durch Progesteron.
3. Auslösung der Brunstschwellungen bei ovarektomierten Pavianweibchen.

4. Beeinflussung von Struktur und Sekretion des Hypophysen-Vorderlappens:
   a) Regeneration der Kastratenhypophyse und Unterdrückung der gonadotropen Sekretion,
   b) Corpus luteum-Bildung bei infantilen Rattenweibchen durch Beeinflussung der luteotropen Sekretion des HVL,
   c) Hypophysenvergrößerung und Strukturveränderung bei Überdosierung.

Drei Frauen stellten sich für die klinische Prüfung zur Verfügung, aber nach oraler Einnahme stellte sich schweres Erbrechen ein, welches nach einigen Stunden wieder abklang, ohne Schaden zu hinterlassen. Deshalb wurde von der weiteren Bearbeitung dieses Themas Abstand genommen. BUTENANDT[9] untersuchte den vorliegenden Wirkstoff weiter und konnte zeigen, daß es sich um einen in Alkohol leicht, in Chloroform und Wasser schwer löslichen Stoff handelte, dessen Schmelzpunkt bei 260°C lag, der FEHLING'sche Lösung reduzierte und äußerst empfindlich war gegenüber chemischen Umsetzungen, insbesondere im alkalischen Gebiet. Die wahrscheinlichste Summenformel entspräche dem Ausdruck $C_{19}\ H_{20}\ O_6$. Entscheidend war die Feststellung, daß der vorliegende Wirkstoff als sicher verschieden von allen im Tierreich vorkommenden Vertretern der Follikelhormongruppe erkannt wurde.

Nach BRADBURY und WHITE[10], sowie SCHERING-KAHLBAUM-AG[11] ist die Summenformel des Stoffes $C_{19}\ H_{22}\ O_6$, mit einem Schmelzpunkt bei 276°C. Somit war also zu diesem Zeitpunkt der Stand der Erfahrungen folgender:

Es gibt unter den östrogen wirksamen Pflanzenmaterialien solche, die ein echtes, chemisch definiertes Östrogen

enthalten (BUTENANDT, JACOBI und SKARŻYŃSKI) und andere, deren chemische Konstitution unbekannt, aber sicher nicht identisch mit Östrogenen ist (BRADBURY, WHITE u.a.).

In der Folgezeit ist viel über die Kleeart Trifolium subterraneum als Phytoöstrogenträger gearbeitet worden, nicht im Sinne einer systematischen Suche nach wirksamen Pflanzen, sondern im Zusammenhang mit der Erforschung pathogener Ursachen in der Nahrung von Weidetieren. Der Vorgang war folgender:
Zwischen 1938 und 1940 konnte im westlichen Australien mit dieser Kleeart der Ertrag der Schafhaltung bedeutend gehoben werden. Der Ertrag der Weiden stieg auf das Vierfache an, und viele Schafhalter stellten ihre Weiden auf diese Kleeart um. Bald konnten aber bei einem Großteil der Schafe Fertilitätsstörungen beobachtet werden, vor allem zeigten weibliche Tiere Nymphomanien und Scheidenvorfälle, die bei einzelnen Tieren sogar zum Tode führten. Pathologisch-anatomisch war vor allem die Uterusschleimhaut, kaum aber das Ovarium verändert. Die Unfruchtbarkeit der betroffenen Tiere war anhaltend, auch wenn sie monatelang ja teilweise mehr als zwei Jahre lang wieder auf kleefreie Weiden gebracht wurden. Geschlechtsreife Böcke blieben im allgemeinen verschont. Kastrierte Widder zeigten dagegen nicht selten Laktationseffekte, die aber durch Testosterongaben aufzuheben waren. Diese für den Tierzüchter unerwünschten Vorgänge waren Anlaß, an Hand des reichen Materials die Ätiologie dieser Massensterilität zu erforschen. Zunächst galt es, einen krankmachenden Faktor oder Stoff zu isolieren. Für das Vorliegen eines solchen Stoffes mit sexualhormonartigen Wirkungen sprachen viele Umstände, u.a.

auch das Ergebnis von Fütterungsversuchen an Meerschweinchen. Rätselhaft blieb aber, warum nur diese Standortvarietät des Klees plötzlich sexualaktive Stoffe in so reichem Maße enthalten sollte. Vor dem Jahre 1941 nämlich, waren derartige Erscheinungen trotz ausgiebiger Verfütterung desselben Klees unbekannt. Ebenso unklar war es, warum Rinder und Pferde, die auf der gleichen Weide grasten, keinerlei Störungen ihrer Fortpflanzung zeigten. Man dachte an eine Vergiftung des Bodens mit Kunstdünger, an eine Viruserkrankung der Kleeart, an Mangelzustände des Bodens und an alle möglichen anderen Umwelteinflüsse. Keine dieser Deutungen hielt einer experimentellen Prüfung stand. Beachtlich war, daß in der üblichen Weise getrockneter Klee verhältnismäßig unschädlich war und daher schon mit dem Übergang zur Stallfütterung Schäden ausblieben. Bei der künstlichen Trocknung ohne Einwirkung von Licht und Sauerstoff blieb dagegen die toxische Wirkung erhalten. Soweit KOLLER[12)] 1955 im Rahmen eines Sammelreferates: "Spezifisch (tier-) sexualaktive Stoffe in Pflanzen".

BENNETTS und Mitarb.[13)] berichteten über das häufige Auftreten von cystisch glandulärer Hyperplasie des Endometriums bei den betroffenen Schafen. Sie erzeugten ähnliche Veränderungen im Endometrium von Meerschweinchen, die ausschließlich entweder mit frischem grünen, luftgetrockneten oder künstlich getrocknetem Klee von einer solchen "krankmachenden" Weide gefüttert wurden. Die Untersucher stellten folgende klinischen Symptome bei Schafen unter Klee-Einwirkung fest: Geburtsstörungen von Seiten des mütterlichen Tieres, Uterusvorfall und weibliche Sterilität. Außerdem fanden sie gelegent-

lich Wachstum der Brustdrüsen bei unbefruchteten Weibchen und, wie bereits erwähnt, bei Widdern, sowie zahlreiche Fälle von Euterentwicklung und Milchsekretion bei ganz jungen und bei unbefruchteten Tieren, besonders während des Frühlings und Vorsommers, wenn die Tiere auf Weiden grasten, die vorwiegend diese Kleeart aufwiesen. Das mikroskopische Bild zeigte normal funktionierende Mammae mit voll ausgebildeten tubulo-alveolären Drüsen. Die Analyse des Sekretes ergab Ähnlichkeit mit Kolostrum. Über laktierende Widder wurde laufend berichtet. BENNETTS rief die gleichen Erscheinungen durch intramuskuläre Injektion von 1,2 mg Stilboestrol über vier Wochen bei Merinowiddern hervor. Es traten sowohl Brustdrüsenentwicklung als auch Milchsekretion auf. Dies, zusammen mit der Demonstration einer desquamativen Metaplasie der sekundären Geschlechtsorgane, insbesondere der bulbourethralen Drüsen beim Widder, ließ das Vorhandensein einer östrogen wirksamen Substanz in diesem Klee sehr wahrscheinlich erscheinen. BENNETTS u.a. bemerkten jedoch beim Schaf und beim Meerschweinchen keinerlei Zyklusstörungen, wie man sie erwarten konnte bei regelmäßiger Applikation von hohen Dosen eines normalen Östrogens. Die Gesamtheit der Umstände ließ also viele Deutungsmöglichkeiten zu.

CURNOW und Mitarb.[14] berichteten 1948 folgendes über östrogene Aktivität von Trifolium subterraneum. Versuche mit normalen Meerschweinchen: Klee wurde zerkleinert, mit Äther oder wäßrig extrahiert, Konzentrate oral mit Körnerfutter oder Buttermilch verabreicht, tägliche Gaben entsprechend 30 g Frischklee während

28 Tagen. Nach Tötung der Tiere zeigten die Uteri der mit Ätherextrakt gefütterten Tiere deutliche cystisch glanduläre Hyperplasie des Endometriums, während bei den übrigen keine Veränderungen zu sehen waren. Zyklusstörungen wurden nicht beobachtet. Versuche mit ovarektomierten Mäusen: Einer Gruppe wurde vier Tage lang je 0,04 Gamma Östradiol in 0,1 ml Olivenöl gelöst injiziert. Die andere Gruppe bekam von dem Ätherextrakt je das Äquivalent von 5 g Klee per os.

Die hervorgerufenen Veränderungen in jungen Mäusen durch den Klee-Extrakt und durch Östradiol waren q u a l i t a t i v gleich in Bezug auf geschlechtliche Frühreife (im engl. Original: vaginal opening), vaginale Verhornung und Uterushypertrophie. Die östrogene Wirksamkeit gemessen an diesen Kriterien war aber sehr gering. Dieses Versuchsergebnis paßte nicht so recht in die Überlegungen der Autoren, nachdem man im Laboratorium und auf den Weiden eine Wirksamkeit der ganzen Kleepflanze gefunden hatte. Man suchte daher nach Möglichkeiten der Erklärung des Ergebnisses und vermutete die Divergenz

1.) in einer unvollständigen Extraktion der Frischpflanze, oder
2.) in der unterschiedlichen Qualität zwischen der wirksamen Substanz und den bekannten Östrogenen,
3.) in einer Zerstörung der aktiven Substanz während Trocknung und Lagerung,
4.) in spezifischen Verschiedenheiten in Resorption und Verwertung.

Ebenfalls von den letztgenannten Autoren wurden Versuche zur Bildung von Endometriumcysten bei Mäusen vorgenommen:
Drei Monate alte Mäuse bekamen 28 Tage lang Kleeätherextrakt in Dosen von 3 mg/Tier und Tag. Daraufhin waren die Uteri vergrößert aber histologisch normal. Die Abstriche zeigten andauernde vaginale Verhornung, manche Tiere blieben vom 3. bis zum 20. Tag im "Vollöstrus".

Es war bekannt, daß der Meerschweinchenuterus besonders leicht Endometriumcysten entwickelt. Dies und die Cystenbildung bei Schafen suchte man als spezifische Empfindlichkeit des Uterus bei diesen Tieren gegenüber östrogener Stimulation im Gegensatz zu den Mäuseuteri zu erklären.

BENNETTS und UNDERWOOD[15] berichten 1951 noch, daß es ihnen gelungen sei, bei Schafen die nach Ovarektomie zwangsläufig auftretende Uterusatrophie mit Stilböstrol und außerdem durch Halten auf Weiden, die reich an Trifolium subterraneum waren, zu verhindern, bzw. bei späterem Beginn rückgängig zu machen. Sie bestätigten auch die frühere Beobachtung, daß frischer grüner Klee relativ stark wirksam, während getrockneter Klee nur wenig wirksam sei.

Es war vom biochemischen Standpunkt aus beachtlich, daß eine Substanz aus Klee isoliert werden konnte, die zwar östrogene Wirkung habe, nicht aber mit den tiereigenen Östrogenen identisch war. 1952 beschrieben CURNOW und BENNETTS[16] die Isolierung von 5,7,4-Trioxyisoflavon, Genistein genannt, aus Trifolium subterraneum, das sie für die östrogen wirksame Substanz dieses Klees hielten. Da diese Substanz aber

eine völlig andere chemische Struktur als die tierischen, echten Östrogene hat, blieb die Wirkungsweise des Stoffes auf die Sexualorgane problematisch.

1936 berichtete LAQUER[17], daß tägliche Injektionen von 10 Gamma Östron an kastrierten männlichen Mäusen über einen Zeitraum von 14 Tagen metaplastische Veränderungen in der Prostata hervorrufen, die bei gleichzeitiger Injektion von 500 Gamma Dehydroandrosteron täglich entweder vollkommen ausbleiben oder nur vermindert auftreten würden.

Dies und die bereits erwähnte Beobachtung, daß normale geschlechtsreife männliche Schafe keine Folgeerscheinungen durch den Klee aufwiesen, sowie die Annahme, daß dies auf kompensierende Androgeneinwirkung zurückzuführen sei, veranlaßte EAST und Mitarb.[18] zu folgenden Untersuchungen an kastrierten männlichen Meerschweinchen und an Widdern:
Bei Schafen, die auf einer Weide grasten, die ausreichend mit Trifolium subterraneum bewachsen war, um bei einer Kontrollgruppe kastrierter Tiere die bekannten Symptome hervorzurufen, gewährten Injektionen von 20 mg Testosteronpropionat dreimal wöchentlich während neun Wochen einen vollen Schutz gegen pathologische "östrogene" Einwirkungen. Nebenbei genügten diese Mengen darüberhinaus völlig zur normalen Entwicklung der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale.

Die Ergebnisse der Versuche mit Meerschweinchen waren im wesentlichen dieselben. Bei Injektionen von 1 mg Testosteron an verschiedenen Tagen während 8 Wochen

wurde ein hoher, aber nicht vollkommener Schutz erreicht. Dies deutet darauf hin, daß hier nicht genügend Testosteron gegeben worden war, obwohl es zur Vollausbildung aller sekundären Geschlechtsmerkmale ausreichte, wie ein Vergleich mit den Organen normaler männlicher Meerschweinchen ergab.

Ein wichtiger Punkt war der Vergleich der Wirkung gefütterten Kleeöstrogens und injizierten Stilboestrols. Die Unterschiede waren minimal. Die Messung der Mammillenlänge und Organgewichte zeigte keine Verschiedenheiten, die man auf die Behandlung hätte zurückführen können. Histologisch fand man bei den mit Stilboestrol behandelten Meerschweinchen eine geringfügig stärkere Verhornung der normalerweise einschichtig epithelialisierten Prostatadrüsenstücke und der bulbourethralen Drüsen als bei den kleegefütterten Tieren. Da die Stilboestrolmenge für mehr als doppelt so wirksam als das Kleeöstrogen gehalten wurde, hätte man allerdings größere Unterschiede erwarten können. Man nahm an, daß man bei beiden Gruppen maximale oder annähernd maximale Wirkungen erzielt hatte, die durch größere Mengen, bzw. durch längere Behandlungsdauer nicht wesentlich beeinflußt werden konnte.

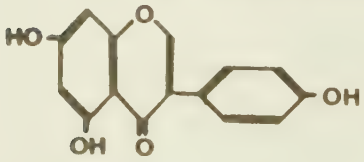
Als Grundlage für die weitere Erforschung der östrogen wirksamen Kleekomponente hat sich das Extraktionsverfahren von ROBINSON[19] bewährt, das von BECK und BRADEN[20] ergänzt wurde. ROBINSON stellte fest, daß alkoholische Natronlauge Extrakte mit höherer östrogener Wirksamkeit erzeugte als Alkohol allein. Die geringere Wirksamkeit des reinen alkoholischen Extraktes führte ROBINSON darauf zurück, daß hier viel

Material vorlag, das nicht in Öl löslich war und die Resorption des Phytoöstrogens im tierischen Organismus hemmte. Diese Erklärung wurde durch die Tatsache unterstützt, daß Verseifung der alkoholischen Extrakte die Menge der ölunlöslichen Bestandteile reduzierte und die östrogene Wirkung erhöhte, Es war bereits bekannt, daß Palmitinsäure und andere Fettsäuren die östrogene Aktivität von Östriol erhöhen. Daher nahm man an, daß der große Anteil der Fettsäuren in den verseiften Extrakten zumindest mitverantwortlich war für die erhöhte Wirkung. Da die Dauer der durchgeführten Hydrolyse nur einen geringen Einfluß hatte, hielt man es für wenig wahrscheinlich, daß das Kleeöstrogen in der Pflanze an Komponenten gebunden sein könnte, die erst durch die Hydrolyse abgetrennt würden.

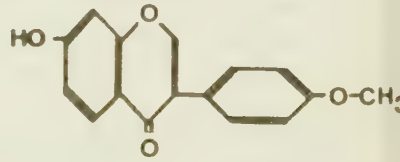
BECK und BRADEN[20)] konnten feststellen, daß es sich beim Kleeöstrogen mit Sicherheit nicht um Östron oder Östradiol handelte. Trotz einer gewissen Ähnlichkeit mit Östriol, scheine es saurer und weniger hydrophil zu sein. Das Ergebnis von Methylierungen war, daß mindestens 2 Phenolringe vorliegen müßten. Nach ROBINSON hat das Kleeöstrogen folgende Eigenschaften: Es ist zumindest teilweise löslich in wässeriger Phase und verdünnten Säuren und sehr gut löslich in Laugen, es ist aus Wasser und verdünnten Säurelösungen mit Äther und aus diesem mit stärkeren Alkalien extrahierbar. Es scheint in Alkohol sehr gut, in Äther und Benzol weniger gut und in Petroläther fast unlöslich zu sein. Es ist gut hitzebeständig, mindestens bis zu 100°C.

ROBINSON entdeckte ferner, daß so gut wie nur die Blätter des Klees die aktive Substanz enthalten und LEGG, CURNOW und SIMPSON[21] konnten zeigen, daß die östrogene Wirksamkeit an die Chloroplastenfraktion gebunden ist. Sie unterschieden rohe Phenole ("crude phenols") von gereinigten Phenolen ("purified phenols"). Die rohen Phenole entsprachen 3 % der ursprünglichen Chloroplasten und enthielten eine ziemlich große Menge von Fettsäuren. Durch eine Zusatzbehandlung, vor allem mit wasserfreiem Methylalkohol, wurden die gereinigten Phenole gewonnen, die keine Fettsäuren enthielten und 40 bis 50 % der rohen Phenole entsprachen. Es stellten sich die rohen Phenole als östrogen wirksamer heraus als die gereinigten.

1951 berichteten BRADBURY und WHITE[22], aus der Chloroplastenfraktion geringe Mengen zweier Isoflavone isoliert zu haben: Genistein und Formomonetin, von denen das erstere als Östrogen aktiv befunden wurde. Ihre chemische Konstitution ist bekannt und ihre Formelbilder sind wie nachfolgend zu schreiben:



Genistein



Formomonetin

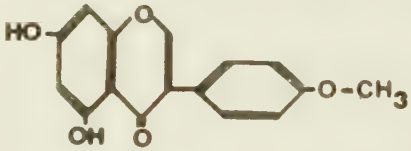
Diese Kenntnisse wurden bis 1953 durch BIGGERS und CURNOW[23] weiter vertieft, und es gelang, 12 mg

Genistein aus 100 g Trockenmaterial der Chloroplastenfraktion des Trifol. subterr. zu isolieren, aus 100 g Trockenklee sogar 369 mg. Genistein aus Klee und synthetisches Genistein wurden von BRADBURY an ovarektomierten Mäusen auf Phytoöstrogenwirksamkeit getestet durch subkutane und intravaginale Injektion, sowie durch Fütterung. Alle Verabreichungen ergaben positive Resultate, wenn auch mit schwankenden Werten. Vaginalabstriche wurden dabei als positiv bewertet, wenn nur kernhaltige und kernlose Epithelzellen enthalten waren, aber auch wenn im Abstrich keine Leukozyten vorkamen. Es wurde errechnet (UNDERWOOD und SHIER[24]), daß Schafe mit den beschriebenen Ausfallserscheinungen nach anhaltender Kleefütterung eine Genisteinmenge entsprechend 850 M.E. aufnahmen.

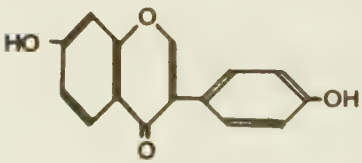
UNDERWOOD und SHIER erzeugten Unfruchtbarkeit von Schafen bei einer Verabreichung von 4 000 M.E. Stilboestrol täglich über einen Zeitraum von sechs Monaten. Mit diesem Vergleich wurde dann erklärt, weshalb sich bei den betroffenen australischen Schafen Störungen erst nach einigen Jahren einstellten. Aufgrund besonderer Versuche nahm EMMENS an, daß Genistein ein "Proöstrogen" sei, das erst durch unbekannte Stoffwechselvorgänge in ein direktes Östrogen umgewandelt würde. Nach der Versuchstechnik von EMMENS[25,26] wird die Vagina künstlich in zwei Räume geteilt. EMMENS fand, daß die Mindestdosis eines echten Östrogens bei intravaginaler Injektion direkt auf die Zellen wirkt und auf der einen Seite Verhornung der Epithelzellen hervorruft, während dieselbe Menge eines "Proöstrogens" auf der anderen Seite noch keine Wirkung zeigt; dieses wirke in höherer Dosis erst nach Resorption und Umwand-

lung auf dem Blutwege auf die Vaginalschleimhaut. Die Autoren kamen zusammenfassend zu dem Ergebnis: Genistein, aus Klee isoliert, ist ein schwach wirksames Phytoöstrogen. In großen Mengen ruft es Fruchtbarkeitsstörungen hervor.

CHENG und Mitarb.[27] gingen 1945 an die Untersuchung synthetisch hergestellter Isoflavonderivate. Sie bestätigen die östrogene Aktivität von natürlichem Genistein, sowie von dessen Glukosid, dem Genistein im Mäuseuterustest. Vier Derivate wurden synthetisiert: Genistein, Formomonetin, Biochanin A und Daidzein. Die Formeln der beiden ersteren habe ich bereits wiedergegeben, die letzteren zeigen folgende Struktur:



Biochanin A



Daidzein

Durchschnittlich 2,5 mg der einzelnen Stoffe wurden täglich Mäusen per os zugeführt und der Effekt an Uterusvergrößerungen festgestellt.

Mäuse-anzahl	Behandlung	Durchschn. Uterus-Gewicht in mg	Ungefähre Wirksamkeit als g Diäthylstilboestrol
6	norm.Kontrolltier	6,4 ± 0,8	0,033
6	2,5 mg Biochanin A	20,9 ± 3,1	0,042
5	2,5 mg Daidzein	26,6 ± 4,1	0,009
6	2,5 mg Formomonetin	8,9 ± 1,2	0,030
5	2,5 mg Genistein	19,3 ± 1,3	
6	0,01 g Stilboestrol	9,4 ± 0,8	
6	0,02 g Stilboestrol	15,7 ± 1,5	
6	0,04 g Stilboestrol	22,2 ± 2,1	
5	0,08 g Stilboestrol	46,2 ± 4,7	

Hier wird also auch dem Formomonetin eine geringe Wirksamkeit zugeschrieben, während BRADBURY und WHITE es für unwirksam hielten. Daidzein zeigte die größte Aktivität, natürliches Vorkommen war aber nicht bekannt. Das Daidzeinglukosid ist jedoch aus Sojabohnenöl isoliert worden. Biochanin A wurde kurz zuvor aus Trifolium pratense gewonnen und als östrogenwirksam erkannt. Die gefundene Wirkungsstärke war klein, das Auftreten der beschriebenen Störungen erst nach Zufuhr großer Mengen des Futters über lange Zeit führte man darauf zurück. Da die Wirkung und Wirkungsstärke auf die Anzahl der freien Hydroxylgruppen und deren Stellung zueinander zurückgeführt wurden (siehe die Konstitutionsformeln), schien es plausibel, daß das Formomonetin mit einer einzigen Hydroxylgruppe die schwächste Wirkung aufwies.

Wir stellen hier die wichtigsten Wirkungen der Klee-Phytoöstrogene, bzw. der entsprechenden Flavone zusammen, wie

sie aus der vorliegenden Literatur zu entnehmen sind: Weibliche Schafe und Meerschweinchen reagierten mit Endometriumcysten. Die Schafe zeigten deutliche Fruchtbarkeitsstörungen. Bei beiden konnten keine Zyklusstörungen festgestellt werden. Bei den Mäusen vergrößerten sich die Uteri, aber histologisch blieben sie normal. Zur Kritik dieser Versuchsergebnisse, besonders hinsichtlich der Methode, die ja bei der Sachlage von ausschlaggebender Bedeutung ist, läßt sich folgendes anführen:

Es ist bekannt, daß Uteri sich nicht nur auf östrogene Stimulation hin vergrößern können. Daher ist der Uterustest unspezifisch. Es ist notwendig, den östrogenspezifischen ALLEN-DOISY-Test heranzuziehen. Dies wurde bei den Mäuseversuchen von CURNOW und Mitarb.[14] 1948 auch gemacht, allerdings bei nicht ovarektomierten geschlechtsreifen Mäusen. Sie fanden teilweise ein anhaltendes Schleienstadium von unterschiedlicher Dauer. Während der Ausarbeitung seiner Extraktionsmethode hat ROBINSON im Zuge seiner ersten Versuche bei Mäusen Scheidenabstriche untersucht, später nur die Uteri gewogen. Im Anfang verwandte er ovarektomierte junge Mäuse, später aus praktischen Gründen nur infantile, nicht ovarektomierte Tiere, da er keine wesentlichen Unterschiede in der Wirkung fand. Er führte zunächst einen Fütterungsversuch aus, dann nur subkutane Injektionen. Die Uteri vergrößerten sich stets, die Scheidenabstriche waren bei den meisten Tieren positiv. Die Uteri reagierten zum Teil auf kleinere Dosen als die Vaginalepithelien. Diese Abstriche wurden also an ovarektomierten oder infantilen und ovarektomierten Mäusen durchgeführt. Hier hat man eine bessere Kontrolle als bei den geschlechtsreifen nicht ovarektomierten Tieren, denn bei letzteren war das anhaltend

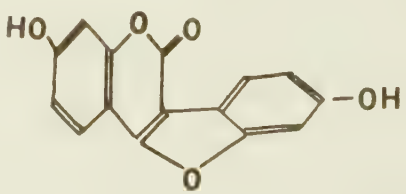
Schollenstadium von unterschiedlicher Dauer. Man unterscheidet bei der Maus einen vollständigen (9 bis 10 Tage) und einen unvollständigen Zyklus (4 bis 5 Tage). Das Schollenstadium, die Brunst, wird durch Follikelhormonwirkung ausgelöst, es kommt bei unvollständigem Zyklus zustande, aber nur bei vollständigem Zyklus schließt sich dann ein Follikelsprung an. Somit liegen hier ganz andere Verhältnisse vor als beim Menschen. Die Brunst hält ein bis zwei Tage an. Die Beurteilung bei den geschlechtsreifen nicht ovarektomierten Tieren ist demnach nicht einfach. Bei den ovarektomierten Mäusen könnten manchmal Schollenstadien vorgetäuscht sein, wie das bei der Ratte vorkommt. Darüber im Rahmen meiner Versuche.

Phytoöstrogene Wirkungen scheinen nach der Angabe vorliegender neuer Literatur auch in vielen anderen Kleearten vorzukommen. So wurde 1957 erstmals über einen phytoöstrogenen Stoff im Ladino-Klee berichtet und die Struktur eines Cumarins vermutet.

BICKOFF und Mitarb.[28] fütterten über 18 Tage weißen Mäusen einen alkoholischen Extrakt von Ladino-Klee und "kristallisiertes Kleeöstrogen" in Dosierung von 0,5 und 0,75 mg/die. Die Wirksamkeit wurde an Uterusgewichtszunahmen registriert und ergab folgendes Bild:

Testmaterial	Mäuse-anzahl	durchschnittliches Uterusgewicht (mg)
Unbehandelte Kontrolltiere	5	10
Alkoholischer Extrakt von 3,5 kg getrocknetem Kleematerial	5	41
Kristallisiertes Klee-Östrogen (0,5 mg)	5	34
Kristallisiertes Klee-Östrogen (0,75 mg)	5	61
Genistein (15 mg)	4	28
Diäthylstilböstrol (0,2 Gamma)	5	47

Somit ist also das östrogenwirksame Kristallisat aus Ladino-Klee um das 30 fache wirksamer als Genistein, aber auch nur bruchteilmäßig wirksam im Vergleich zu Östriol. BICKOFF und Mitarb.[29] berichteten 1958 über die Isolierung des vermuteten Cumarins aus Ladino-Klee und gaben ihm den Namen Cumöstrol. In der jüngsten Zeit wurde viel über diesen Stoff weitergearbeitet von chemischer Seite und ihm die nachstehende Konstitutionsformel gegeben[30]:



Cumöstrol

Es handelt sich also um einen Körper mit mehreren phenolischen OH-Gruppen.

Da man mit Auffindung des Genisteins und des Cumöstrols als Träger östrogener Eigenschaften oder als Auslöser östrogener Effekte Erfolg gehabt hatte, ging man nun daran, in allen gewöhnlichen Futterpflanzen, schlechthin in Grasfutter, nach östrogener Wirksamkeit zu suchen. Es sollen hier nicht alle Pflanzen einzeln aufgezählt werden. Tatsächlich fanden BARTLETT und Mitarb.[31] 1948, LEGG und Mitarb.[21] 1950, DOHAN und Mitarb.[32] 1951, CHENG und Mitarb.[33, 34] bei vielen Gras- und Kleearten östrogene Aktivität, während in Deutschland SCHOOP und Mitarb.[35-40] alle Futterpflanzen östrogen aktiv fanden. Dies ist ein Unterschied, der Bedenken auslöst. Auch hier liegen die Bedenken zunächst auf methodischer Ebene. SCHOOP und Mitarb. haben nämlich auch fast ausschließlich den Uterusgewichtstest angewandt und nur in "Grenzfällen" Scheidenabstriche geprüft. SCHOOP schreibt, daß, wenn das Uterusgewicht erhöht ist, der Scheidenabstrich immer Schollenstadium aufweisen würde. Das trifft aber unseres Erachtens sicherlich nicht zu, denn erstens ist der Uterusgewichtstest nicht spezifisch für östrogene Wirksamkeit und zweitens zeigten die Ergebnisse der Untersuchungen des Trifolium subterraneums von ROBINSON u.a., daß die Uteri auf kleinere Dose deutlich reagierten, die nur in 50 und 60 % der Tiere ein Schollenstadium hervorriefen.

Die ersten Untersuchungen gingen von der Beobachtung der Einwirkung des Frühjahrsgrases auf die Kuhmilch aus. ROWLAND[41] und BARTLETT und ROWLAND[42] studierten Variationen in der Zusammensetzung der Kuhmilch: während der Wintermonate nimmt der Gehalt der Kuhmilch an nicht fetthaltigen Bestandteilen fortschreitend ab, um schnell

wieder anzusteigen, wenn die Kühe im Frühjahr auf die Weiden kommen. Ebenso häufig zeigt sich ein erhöhter Milchertrag im Frühjahr, der aber größer ist, als die zuschreibbaren Extranährstoffe erwarten lassen. Versuche, diese Wirkung auch im Winter durch beliebige Zusätze von Kohlenhydraten, Proteinen oder Carotinen zu den gewöhnlichen Winterrationen der Kühe zu erzielen, blieben ergebnislos, Deshalb wurde ein Faktor mit Hormon- oder Vitamincharakter angenommen. Andererseits fand FOLLEY[43] 1936 bei laktierenden Kühen, denen er tierisches Östrogen injizierte, eine erhebliche Hemmung der Laktation im Sinne eines quantitativ geringeren Milchertrages bei gleichzeitig beträchtlicher Vermehrung der fetthaltigen und nicht fetthaltigen Bestandteile gegenüber vorher. FOLLEY und Mitarb.[44] demonstrierten diese Wirkung, die sie als "enrichment effect" bezeichneten, mit Frühjahrsgras.

BARTLETT und Mitarb.[31] extrahierten Grasproben von einer Anzahl von Weiden nach der ROBINSON-Methode (s. oben) und injizierten die Extrakte infantilen weiblichen Mäusen sechsmal über drei Tage verteilt subkutan. 18 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet, die Uteri herausgenommen und auf Gewichtszunahme geprüft (jede Gruppe enthielt 6 Mäuse). Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, die erste mit früh blühenden Grasproben im Mai 1948. Durch ungünstige Wetterverhältnisse war das Wachstum beeinträchtigt gewesen; Kühe, die dort weideten, zeigten mäßige Erhöhung des Milchertrages und der nicht fetten Milchbestandteile.

Die zweite Versuchsreihe wurde im Juni desselben Jahres mit Grasmaterial von verschiedenen Weiden durchgeführt und mit Heu, das ein Jahr alt war. Zum Vergleich wurde auch Östradiol in zwei Dosierungen mehreren Tieren injiziert.

Gruppen	Behandlungen	Uterusgewicht (mg)
	1. Versuchsreihe	
1.	keine	7,8 ± 0,8
	Gras Nr. 1:	
2.	Extrakt von 0,75 g Trockenmaterial	14,2 ± 1,1
3.	Extrakt von 1,50 g Trockenmaterial	24,5 ± 2,4
	Gras Nr. 2:	
4.	Extrakt von 0,75 g Trockenmaterial	19,6 ± 1,7
5.	Extrakt von 1,50 g Trockenmaterial	20,0 ± 1,2
6.	0,03 mg Alpha-Östradiol	23,0 ± 1,8
7.	0,06 mg Alpha-Östradiol	29,3 ± 3,0
	2. Versuchsreihe	
8.	keine	5,3 ± 0,4
9.	Erdnußöl	6,4 ± 0,5
	Gras Nr. 3:	
10.	Extrakt von 0,75 g Trockenmaterial	8,8 ± 0,9
	Gras Nr. 4:	
11.	Extrakt von 0,75 g Trockenmaterial	9,9 ± 0,8
12.	Klee-Extrakt von 0,75 g Trockenmaterial	15,1 ± 1,0
13.	Heuextrakt von 0,75 g Trockenmaterial	6,3 ± 0,8
14.	0,03 mg Alpha-Östradiol	17,4 ± 1,5

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß, vom Östradiol abgesehen, das Junigras am aktivsten war. Der Heuextrakt war praktisch inaktiv. Es ist bemerkenswert, daß die Verdoppelung der verabreichten Dosis unregelmäßig höhere Werte erbrachte. Es wurden auch in dieser Arbeit keine Scheidenabstriche untersucht.

Einer Reihe von anderen Gräsern und Kleearten wird östrogene Wirksamkeit zugeschrieben, darunter Trifolium pratense und das Raygras (LEGG und Mitarb.[21]), DOHAN und Mitarb.[32]) CHENG und Mitarb.[33]) und POPE und Mitarb.[45]). Dagegen fanden die Autoren in Trifolium repens, Alfafa, Luzerne und anderen keine Wirksamkeit. Übereinstimmend stellten alle Untersucher fest, daß die Frühjahrsgräser weit wirksamer seien als die Gräser und Kleearten im Herbst. LEGG und Mitarb. geben die Art des gewählten biologischen Testes nicht an, aber DOHAN und Mitarb. arbeiteten mit ovarektomierten erwachsenen Mäusen, denen sie die Extrakte injizierten und nach 72 und 96 Stunden Scheidenabstriche entnahmen; ferner untersuchten sie auch Uterusgewichte. Alle Mäuse der ersten Gruppe entwickelten angeblich nach Injektionen von Raygrasextrakte und von Extrakten vom Klee Trifolium pratense einen Vollöstrus und die Mäuse der zweiten Gruppe wiesen eine Erhöhung der Uterusgewichte auf.

In Deutschland beschrieb SCHOOP[35]) 1952 erstmals Fruchtbarkeitsstörungen bei Rindern, die er auf starke Jauchedüngung der Futterweiden zurückführte. Zusammen mit KLETTE und RENNER hat er ausgedehnte Untersuchungen angestellt. Nach seinen Angaben haben alle Pflanzen phytoöstrogene Wirkungen. Es wurden folgende Gräser geprüft (SCHOOP und Mitarb.[36]):

Gräser:	Extraktmenge in g/kg Trockensubstanz
1. Wiesenschwingel, Festuca pratensis	
Sorte: Steinacher	5,765
2. Wiesenrispe, Poa pratensis	
Sorte: Steinacher	4,670
3. Goldhafer, Avena flavescens	
Sorte: Steinacher	3,416
4. Wiesenfuchsschwanz, Alopecurus pratensis	
Sorte: Handelssaat	5,281
5. Fruchtbare Rispe, Poa fertilis	
Sorte: Brauns Weihenstephaner	3,854
6. Weißes Straußgras, Agrostae albe	
Sorte: Oberhaunstädter	6,237
7. Glatthafer, Avena decior	
Sorte: Odenwälder	6,188
8. Wiesenlieschgras, Phleo pratense	
Sorte: Odenwälder	3,478
9. Knaulgras, Dactylis glomerata	
Sorte: v.Kameke	5,003
10. Deutsches Weidelgras, Lolium perenne	
Sorte: Lembkes normal	3,376
11. Deutsches Weidelgras	
Sorte: Odenwälder	3,508
12. Deutsches Weidelgras	
Sorte: M.F.G.	5,577
13. Rotschwingel, Festuca rubra	
Sorte: Odenwälder	6,527
14. Welsches Weidelgras, Lolium italicum	
Sorte: Ostsaat	6,145

Die Gräser waren sämtlich unter annähernd gleichen Verhältnissen gewachsen, ohne Stalldünger, am gleichen Ort und auf gleichem Boden. Sie wurden im Mai geschnitten und nach eigener Extraktionsmethode behandelt (SCHOOP und KLETTE[37]).

In Vorversuchen wurden 0,01 ccm einer 10 %igen Öllösung von verschiedenen Grasextrakten sowohl subkutan injiziert als auch gefüttert. Versuchs- und Kontrollmäuse wurden getrennt gehalten. Es wird berichtet, daß in der Hälfte der Fälle die Reaktion an den Geschlechtsorganen der Versuchstiere bei Verfütterung der zu prüfenden Substanzen stärker war als bei der Injektion. In keinem Fall habe die Injektion eine stärkere Wirkung zufolge gehabt. Ungleiche Resorptionsverhältnisse bei der Injektion öliger Lösungen wurde angenommen. Sie haben daher in der Folgezeit ausschließlich verfüttert. Die Extraktionslösungen wurden mit einer passenden Menge Grundfutter vermischt, Tötung der Tiere zwei bis drei Tage nach Versuchsbeginn und anschließend makroskopische Beurteilung der Uterusvergrößerung mit Gradbezeichnungen + bis +++++. Es wurde stets gleichzeitig eine Kontrollmaus getötet, um den Normaluterus eines gleichaltrigen Tieres zum Vergleich zu haben. Dabei wird mit einer Mäuseeinheit (M.E.) gearbeitet, die definiert wird als diejenige Östrogenmenge, die innerhalb von 48 Stunden eine deutlich erkennbare Uterusvergrößerung zur Folge hat. Aus der hier nicht wiedergegebenen Tabelle der Autoren geht hervor, daß bei genügenden, nicht einmal großen Mengen von verabreichten 10 %igen öligen Lösungen bei allen Grasarten deutlich nachweisbare Wirkungen zu beobachten sind, auf vergleichbare Mengen

umgerechnet von 500 bis 13,000 Mäuseeinhaiten der angegebenen Definition.

SCHOOP und Mitarb. nehmen an und wollen gefunden haben, daß die vaginale Brunstreaktion durch kleine Mengen hervorgerufen werden kann, die eine kaum meßbare Uterusvergrößerung bewirken. Ich habe bereits erwähnt, daß aus den Versuchen von ROBINSON das Gegenteil hervorging und daß außerdem der "Uterustest" nicht als östrogenspezifisch allgemein anerkannt wird. Als ein interessanter Nebenbefund wurde angegeben, daß Mäuse innerhalb von zwei bis drei Tagen auffallende Größenzunahme zeigten, und zwar vermehrten sich die Gewichte in dieser Zeit um Werte bis zu 30 %. Da vielfach nicht die entsprechende Futtermenge verzehrt worden war, nehmen die Untersucher an, daß es sich zum Teil um Wasserretention im Gewebe gehandelt haben müßte. Es wird betont, daß die gefundenen Werte nur ungefähre Größen darstellen und vermutet, daß sie teilweise wesentlich höher liegen dürften. Außerdem sei zu berücksichtigen, daß sich die Werte auf Heu beziehen und deshalb zwecks Umrechnung auf Frischmaterial durch vier zu dividieren seien. In der Besprechung der Ergebnisse werden viele Erörterungen theoretischer Art angestellt, auf die ich hier nicht eingehen will. Die Ergebnisse von SCHOOP und Mitarb. können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Alle geprüften Gräser verursachten Uterusvergrößerungen.
2. Die an Uterusvergrößerungen festgestellte Wirkung war für die einzelnen Grasarten sehr verschieden stark: zwischen 50 und 13,000 M.E. (die Mäuseeinheit nach SCHOOP siehe oben).

3. Da die tierischen Östrogene per os nur unterschwellig wirksam sind, wie hier bestätigt wurde, müssen die fraglichen Phytoöstrogene in ihrer chemischen Struktur anderer Art sein als die tierischen Östrogene.
4. Das Auftreten von Uterushyperämien konnte festgestellt werden.

SCHOOP und KLETTE[38] haben ihre Untersuchungen auch auf andere Futterpflanzen, bzw. daraus hergestellte Materialien z.B. Futterkonserven, Silagen, Rübentrockenschnitzel, Kleie etc. ausgedehnt. Es wurden infantile Mäuse verwendet und teilweise nach der Injektionstechnik verfahren, teilweise wurden Fütterungen durchgeführt. Die Untersucher betonen, daß hier geringgradige Differenzen entstanden sein könnten.

Sämtliche untersuchten Stoffe waren nach SCHOOP phytoöstrogenhaltig. Daraus wurde gefolgert, daß die verantwortliche Substanz ein normaler Bestandteil dieser Pflanzen sein müsse. Die gefundenen Mäuseeinheiten schwankten außerordentlich stark (zwischen 25 und 10213).

SCHOOP und KLETTE[39] wurden auch zur Beurteilung eines Bestandes von weiblichen Zuchtsauen zugezogen, bei denen starke Veränderungen an den Geschlechtsorganen aufgetreten waren (dunkelrote bis blaue Verfärbung und Schwellung der Scheidenschleimhaut, sowie teilweise Prolapsus vaginae).

Das Futter der Tiere bestand aus Silokartoffeln, Rüben und geringen Zusätzen von getrockneten Zuckerrübenschnitzeln, sowie Kraftfutter aus etwa: 85 % Gersten-Roggenschrotgemisch, 2,5 % Salzbrezelbruch, 10 % Fischmehl, 2 % Mineralstoffgemisch und 0,5 % gepulverte Holzkohle.

Die verwendeten Roggen und Gersten waren während der Erntezeit schlecht eingebracht worden und zeigten an der Oberfläche der Körner Schimmelbildung. Abstriche aus der Vaginalschleimhaut der Tiere zeigten kernlose Plattenepithelzellen in zusammenhängenden Schollen. Ich möchte bemerken, daß einige derartige Schollennester auch bei ovarektomierten Laboratoriumstieren von Zeit zu Zeit auf treten können. Nach Fütterung von 3 bis 4 infantilen weiblichen Mäusen mit der beschriebenen Futterform sahen die Autoren Effekte wie erwähnt. Schafe und Schweine bekamen Brezelmehl und ein Roggenschrotgemisch. Das Roggenschrotgemisch verursachte starke Schwellungen und Rötungen der Schamlippen und der Vaginalschleimhaut. Scheidenabstriche zeigten "Plattenepithelschollen" in großen Mengen zum Teil mit, zum Teil ohne Kerne. Nach Schlachtung der Tiere fanden sich Umfangsvermehrung und starke Hyperämie des Uterus. Die Ovarien waren kleincystisch entartet. Histologisch zeigte der Uterus Kapillarerweiterungen und Uterindrüsen in Tätigkeit; das Epitnel wies Kernteilungen auf und war mehrschichtig. Auch Submucosa und Muscularis waren gegenüber Vergleichsschnitten gleichaltriger normaler Schweine verdickt.

Unsere Kritik zu diesem Ergebnis: Wir halten diese Erscheinungen nicht für einen Beweis einer Phytoöstrogenspezifität. Vaginalabstriche können, wie immer wieder festgestellt, zusammenhängende Plattenepithelien und Schollen auch ohne östrogene Stimulierung enthalten. Inwieweit der Pilzbefall für östrogene Wirksamkeit des Roggens verantwortlich sein könnte, wird offen gelassen KULCSAR-GERGELY[46]) entdeckten nämlich 1960 östrogene Aktivität in wäßrigen Extrakten aus Penicillin-Myce-

lien. Die Prüfung erfolgte an geschlechtsreifen ovarektomierten und infantilen Ratten. In allen Versuchen hätten sich die Penicillin-Extrakte als "wirksam" erwiesen. Im trockenen Rückstand des Petrolätherextraktes fand sich die Hauptmenge der Aktivität. Dieser in 90 %igem Alkohol lösliche Rückstand verursachte bei ovarektomierten Ratten Östrus. Die Wirkung sei anhaltend gewesen. Eine Toxizität wurde nur in höheren Konzentrationen und nach Erhitzen auf über 50°C beobachtet. Es geht aus dem uns zugänglichen Referat nicht hervor, welche Ansprüche an die "Brunstreaktion" der ovarektomierten Ratten gestellt wurden. Es ist jedenfalls nicht ausgeschlossen, daß der Pilzbefall des von SCHOOP verwendeten Getreides möglicherweise für die hervorgerufenen Erscheinungen verantwortlich war. Prinzipiell denkbar ist auch die Bildung von östrogen wirksamen Stoffen aus Pflanzensteroiden durch Mikroorganismen. 1952 machten PETERSON und Mitarb.[47] die grundlegende Entdeckung, daß gewisse Mikroorganismen Steroide selektiv und in guter Ausbeute am C-Atom 11 oxydieren. Wie man weiter feststellte, oxydieren andere Mikroorganismen an den C-Atomen 17 und 21 .

1956 hielt SCHOOP auf dem III. internationalen Kongreß über die Fortpflanzung der Tiere in Cambridge einen Vortrag[40], in welchem er über seine Pflanzenuntersuchungen berichtete. Er zeigte, daß die gefundenen Phytoöstrogenmengen zwischen einigen 20 und mehreren 10 000 Mäuseeinheiten (diese nach seiner Definition) schwankten und daß er keine phytoöstrogenfreien Pflanzen gefunden habe. Er stellte den Begriff der "Hyperöstrogenose" auf und verstand darunter morphologisch

faßbare Störungen als Folge von Verabreichung phytoöstrogener Stoffe, ohne aber Angaben über die Mengenverhältnisse, oder einen Dosis-Zeit-Faktor zu machen. Solche zu einer Hyperöstrogenose gehörigen Symptome sind etwa die nachfolgend aufgeführten:

1. An den äußeren Genitalien:
   Mehr oder weniger starke Schwellung und Rötung.
2. An der Vagina:
   Vermehrte Sekretion, Bildung von verhornten Plattenepithelien und Prolapsus vaginae.
3. Am Uterus:
   Umfangsvermehrung, vermehrte Sekretion, Blutungen.
4. An den Milchdrüsen:
   Drüsenwachstum, Laktation sowohl bei virginilen als auch bei ovarektomierten Tieren, zum Teil bei männlichen Kastraten.

Mit diesen Erscheinungen in Verbindung soll stehen: Geschlechtliche Frühreife, Brunst, die von der Ovulation unabhängig ist und zum Teil auch gravide Tiere betrifft, Abortus in allen Trächtigkeitsstadien, Sterilität (sie geht nicht auf Ovulationsstörungen, sondern offenbar auf Nidationsschwierigkeiten der befruchteten Eier zurück).

Die bis 1957 nach SCHOOP ermittelten chemisch-physikalischen Eigenschaften der Pflanzenöstrogene sind:

1. enterale Wirksamkeit
2. hohe Hitzebeständigkeit
3. hohe Resistenz gegen Säuren
4. relativ hohe Resistenz gegen Alkalien

Die Arbeiten von SCHOOP und Mitarb. wurden hier auch deshalb so ausführlich zitiert, weil die Erkenntnis

Umbau und Freilegung bzw. Neubildung von, vom Standpunkt der Tierernährung unerwünschten Stoffen zu rechnen. Versuche einer chemischen Aufklärung des wirksamen Stoffes wurden nicht unternommen.

Seit jeher interessierte der Weizenkeim die Chemiker und Ernährungsphysiologen, die auf dem Gebiet der Diätetik und Kosmetik arbeiten. 1951 untersuchte LEVIN und Mitarb.[49] Weizenkeimöl auf östrogene, androgene und gonadotrope Wirksamkeit. Es wurden zahlreiche Testierungen mit Weizenkeimöl, ranzigem Weizenkeimöl und Tocopherol durchgeführt. Die östrogene Aktivität des Weizenkeimöls wurde an folgenden Kriterien festgestellt:

1. geschlechtliche Frühreife bei intakten infantilen Ratten.
2. Uterusvergrößerungen bei hypophysektomierten Ratten.
3. Brunstreaktion bei Scheidenabstrich von ovarektomierten Ratten.

Das Weizenkeimöl war bei subkutaner und oraler Applikation wirksam. Ist es überraschend, auch diese Substanz wirksam zu finden, nachdem fast alle untersuchten pflanzlichen Objekte positiv waren? Welche von den vielen Ergebnissen sind reell reproduzierbar? Der Versuch, eine gonadotrope Wirksamkeit festzustellen, ist besonders interessant, weil hierbei auch histologische Untersuchungen der Ovarien und Uteri der verwendeten Hypophysektomierten Ratten vorgenommen wurden.

Die Ovarien der Versuchstiere zeigten beim Vergleich mit denen der Kontrolltiere eine deutliche Zunahme der Follikelanzahl und -größe. Jedoch war das Ausmaß bei den einzelnen Tieren ziemlich verschieden. Bemerkens-

wert ist der Befund, daß höhere Dosen des Weizenkeimölpräparates sich als weniger wirksam herausstellten (!); der Follikeldurchmesser war hierbei im Durchschnitt kleiner (250-275 µ gegenüber 300 µ) und eine geringe Follikelanzahl zeigte Atresie.

Die Uterusreaktion: Kleinere Dosen verursachten ausgesprochene Hyperplasie des Myometriums und vermehrte Vascularisation des Stromas. Bei etwa 60 % der Tiere (ca. 13 von 23 Tieren) war die Uterusschleimhaut in der Proliferationsphase. Höhere Dosen führten zur typischen Zunahme des Stromas, wie man es von östrogener Stimulation erwartet. Die Autoren ziehen deshalb den Schluß, daß die gonadotrope Wirkung so lange in Zweifel stehe, als es nicht gelänge, die östrogen wirksame Komponente abzutrennen.

SCHOOP, KLETTE und NEUMANN[50] schreiben dem Weizenkeimöl etwa 1000 M.E./kg zu. Maiskeimöl soll 6000 M.E. und Reiskeimöl 4000 M.E. enthalten. In einem Weizenkeim-Vollextrakt wurden 8 500 M.E./kg gefunden (GRANDEL[51]).

VAGUE und Mitarb.[52] sprechen auch anderen Pflanzlichen Ölen und tierischen Fetten östrogene Wirkungen zu. Bei den pflanzlichen Ölen wurde Maisöl und bei den tierischen Fetten Butter als wirksamste Substanz bezeichnet; diese Versuche sind mehr als fragwürdig. Denn zahlreiche Untersuchungen, auch die eigenen (s. unten), wurden mit öligen Zubereitungen, teilweise als Langzeitversuch, durchgeführt. Wäre dies richtig, dann müßten die reinen Triglyceride wirksam sein, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren. Das ist aber nicht der Fall, oder aber es müßte sich um unbekannte Beimengungen handeln, dann ist es wiederum unexakt, von einer Wirksam-

keit pflanzlicher oder tierischer Fette und Öle zu sprechen.

1950 erschien eine umfassende Arbeit von COSTELLO und LYNN[53] über Glycyrrhiza glabra. Ausgangspunkt der Untersuchungen war eine Mixtur, die zur Behandlung von Dysmenorrhoen und klimakterischen Beschwerden verschiedener Art angewandt wurde. Die Mixtur setzte sich aus Extrakten von verschiedenen Drogen zusammen, wovon einige offizinell sind. Die Autoren haben von allen einzeln die Phenoltotalfraktion mit Alkohol ausgezogen und im ALLEN-DOISY-Test geprüft. Nur Glycyrrhiza zeigte eine deutliche östrogene Wirksamkeit. Interessanterweise ergaben höhere Dosen eine geringere Aktivität als kleinere, z.B.:

Dosis in Gamma	Prozentzahl der positiven Tiere
30	80,0
60	82,1
120	34,4
200	0,0

Die Erscheinung wurde von anderen Laboratorien bestätigt. Dabei war der Abfall größer als es störende, durch die Extrahierung nicht abtrennbare Komponenten erwarten ließen. Dieser Effekt wurde als "antihormonelles Prinzip" deklariert. Die Absorptionskurve der isolierten Substanz bei der Spektralanalyse stimmte mit Östriol ziemlich überein. Östriol aber ist 1250 mal wirksamer als diese Phenolfraktion. Die Autoren stellten sich auf den Standpunkt, daß es sich um eine Substanz handle, die Ähnlichkeiten mit den tierischen Östrogenen habe.

Auch andere Autoren, HÖLLER und Mitarb.[54], untersuchten erhältliche Succus liquiritiae-Sorten auf östrogene Wirksamkeit. Hierzu wurden Glycyrrhiza glabra-Proben mit 95 %igem Alkohol mazeriert, die vereinigten Extrakte zur Trockne gebracht, mit isotonischer Kochsalzlösung versetzt und weiblichen Ratten als Suspensionen in Dosen injiziert, die 10 g Droge entsprachen. Die biologische Testierungsmethode ist nicht erwähnt. Die Ergebnisse waren negativ.

1952 wurde eine Reihe von biologischen Eigenschaften der "Tillandsia usneoides L" (eine Baumflechte) von FEURT und Mitarb.[55] beschrieben. Hier interessiert nur die Untersuchung der östrogenen Wirksamkeit, die an folgenden Kriterien festgestellt wurde:

1. Ovarektomierte Ratten bekamen innerhalb von 24 Stunden zweimal je 1 mg des Moosextraktes, entsprechend 1 g Pflanze (!). Nach 48 Stunden waren im Vaginalabstrich viele Leukocyten und einige wenige Epithelzellen zu finden, nach 72 Stunden waren die Leukocyten verschwunden und die Epithelzellen zahlreicher vorhanden, nach 96 Stunden waren viele große (kernhaltige!) Epithelzellen zu sehen. Das Auftreten von kernlosen Schollen wurde nicht erwähnt.

2. 18 infantile, weibliche weiße Ratten, die etwa gleichaltrig waren, wurden in 2 Gruppen unterteilt. Eine Gruppe diente als Kontrolle, die andere erhielt zweimal wöchentlich 20 Gamma Moosextrakt (!). Nach 20 Tagen war bei allen behandelten Tieren die Geschlechtsreife eingetreten, aber nur bei zweien von den Kontrolltieren.

3. Injektionen oder orale Gaben des Moosextraktes über längere Zeit hemmten das Wachstum bei infantilen weiblichen Ratten. Bei den Tieren im geschlechtsreifen Alter war dies etwas unterschiedlich, jedoch war die Nachkommenschaft dieser Tiere weniger zahlreich und schwächlich. Die Jungen starben innerhalb von 14 Tagen. ZONDEK[56] hat bereits eine direkte Beziehung zwischen Wachstumshemmung und verabreichter Hormonmengen aufgezeigt und sie auf eine Hypophysenhemmung zurückgeführt.

Diese drei Punkte sprechen für eine östrogene Wirksamkeit des Mooses, jedoch ist die Bewertung der Vaginalabstriche nicht überzeugend.

Auch die Sojabohne wurde in die Untersuchungen mit einbezogen: KENDALL[57] berichtete 1959 über Störungen bei Kaninchen in Neuseeland, die mit getrocknetem Sojabohnenkraut gefüttert wurden. Es traten u.a. Fruchtbarkeits- und Fortpflanzungsstörungen auf. WALZ[58] hat bereits 1931 ein Isoflavonderivat, das Glukosid des Daidzeins, aus Sojabohnenöl isoliert.
CHENG und Mitarb.[34] und CARTER und Mitarb.[59] beschrieben das Vorkommen des Isoflavons Genistein in der Sojabohne und bestätigten östrogene Wirksamkeit dieses Stoffes.

Zu den bekanntesten, angeblich besonders phytoöstrogenwirksamen Pflanzen gehört der Hopfen. KOCH und HEIM[60, 61] schreiben 1953 darüber. Den Anstoß zu ihren Untersuchungen gaben Gespräche in Laienkreisen, wonach bei Frauen, die alljährlich zur Hopfenernte in dem bekannten Anbaugebiet der Hallertau zusammenkommen, angeblich zwei Tage nach Beginn des Hopfenzupfens die Menstruati ganz unabhängig vom Zyklus einsetzen soll.

KOCH und HEIM gingen nun daran, Extrakte aus Tettnanger und Holletauer Hopfen, sowie aus einigen verschiedenen Bierproben herzustellen. Die Substanzen wurden in gereinigtem Maisöl aufgenommen, insgesamt 50 weiblichen weißen Mäusen subkutan injiziert und im ALLEN-DOISY-Test geprüft. Dies sind die Ergebnisse von KOCH und HEIM:

1. Hopfen: Tettnanger Hopfen enthält 30 000 bis 300 000 I.E. östrogene Substanz pro 100 g Extrakt, Holletauer Hopfen I.Qualität 22 600 bis 226 000 I.E. pro 100 g Extrakt.

2. Bier: Märzenbier enthält nach KOCH und HEIM 10 bis 100 I.E. pro Liter Pilsner Art, schwach gewürzt, Stammwürze etwa 12 %, 106 mg Bitterstoffe im Liter: 26 bis 260 I.E., Pilsner Art, stark gehopft, Stammwürze etwa 2 %, 166 mg Bitterstoffe im Liter: 36 bis 360 I.E.

Das positive Ergebnis führte die Untersucher zu der Annahme, daß die bekannte diätetisch günstige Wirkung des in normalem Ausmaß genossenen Bieres zum Teil hormonell bedingt sein könnte. Es wurden auch Überlegungen angestellt in Richtung der medizinischen Verwendungsmöglichkeit von Hopfenpräparaten an Stelle von tierischen Östrogenpräparaten. Der schwache Gehalt des Bieres wird als Möglichkeit für eine Dauerbehandlung mit mäßigen Dosen vorgeschlagen. Von Interesse sind vielleicht noch die vorsichtigen Deutungen, daß Schäden, durch übermäßigen Biergenuß entstanden, zum Teil durch die östrogene Wirksamkeit verursacht worden sein könnten. KOCH und HEIM scheinen das Phytoöstrogen mit tierischen Östrogenen gleich zu setzen. Die chemische

Struktur haben sie nicht aufzuklären versucht.

Bereits vor rund 500 Jahren - knapp 100 Jahre nach der Einführung des Hopfens als Brauzusatz in unserer Gegend - verwendete man das sogenannte Trubbad. Infolge einer tatsächlichen oder vermeintlichen Heilwirkung dieser Bäder, wurde von behördlicher Seite genehmigt, daß die Badestuben in ihren Wannen Hopfen verwenden durften. In der Folgezeit gerieten diese Trubbäder mehr oder weniger in Vergessenheit. Im letzten Jahrzehnt hat sich aber die Wissenschaft damit beschäftigt und HEILMANN[62)] berichtet darüber in der Zeitschrift der Brauwissenschaften 1957.

Bei aller Aufgeschlossenheit kann man aber, vorsichtig ausgedrückt, nicht anders als sich zu wundern über einige Behauptungen und Formulierungen. Zunächst wird sachlich dargelegt, daß der Brauereitrub ein Koagulationsprodukt ist, das sich beim Kochen der Malzwürze mit Hopfen ausscheidet bzw. in der Kälte ausfällt und aus Eiweiß (70 %), Gerbstoffverbindungen und Hopfenharzen (30 %) besteht. Dann wird ausgeführt, der klinische Effekt des Trubes beruhe auf seinem hohen Gehalt an östrogenen Hormonen, sei gut steuerbar und die Dosierung mittels der Methode von ALLEN-DOISY regulierbar (!). Schon nach einer geringen Resorption durch die Haut im Trubbad würde die Eigenbildung der Ovarien angeregt.

Was HEILMANN zu derartigen Aussagen kommen läßt, geht aus seinen Ausführungen nicht hervor. Danach hätten wir es mit einem gonadotrop wirksamen Stoff zu tun und nicht mit einem eigentlichen Phytoöstrogen. Das Anwendungsgebiet erstrecke sich bei der Frau auf alle Formen von Zyklusstörungen und beim Mann käme eine

Trubbehandlung bei gutartigen Prostataadenomen in Frage. Bei beiden Geschlechtern eigne sich die Behandlung bei Durchblutungsstörungen nach Verletzungen und Erfrierungen, varikösem Symptomenkomplex und gegen die WINIWARTER-BUERGER'sche Erkrankung. Dabei wirke sich die Östrogenkomponente jeweils aus. HEILMANN behauptet, das Trubbad vermöge das "Verblühen der Frau um Jahre hinauszuschieben, damit die Fertilitätsperiode und Arbeitsfähigkeit zu verlängern und die Lebenserwartung zu erhöhen".

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang eine Arbeit, die 1959 in der Zeitschrift "Cosmétologie" erschienen ist. ZENISEK und BEDNAR[63)] beschreiben dort die Herstellung von Hopfenextrakten, die sich durch einen verschiedenen Gehalt an Bittersäuren unterscheiden. Im ALLEN-DOISY-Test stellten sie in dem bittersäurereicheren Extrakt einen höheren "Östrogengehalt" fest. Daraufhin gingen sie daran, die "Östrogenstoffe der Bittersäuren" selbst zu untersuchen. Aus technischen Gründen wurde nur eine als Bittersäure β bezeichnete präpariert und mit ihr Versuche angestellt. Sie wurde im ALLEN-DOISY-Test für wirksamer befunden als die beiden ursprünglichen Hopfenextrakte. Einer freundlichen Privatmitteilung der Firma Keimdiät in Augsburg zufolge, ist nach den Angaben von ZENISEK und BEDNAR eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht zu erzielen.

In jüngster Zeit beschäftigte sich SCHÄFER[64)] mit der Isolierung ätherischer Öle und anderer extrahierbarer Substanzen aus Hopfen und deren östrogenen Wirksamkeit.

Nach seinen recht beachtenswerten, weil chemisch und biologisch, sowie technisch einwandfrei durchgeführten Versuchen, läßt sich in Hopfenextrakten eine schwache östrogene Wirksamkeit nachweisen, besonders dann, wenn bei der Aufbereitung der Hopfenextrakte hydrolytische Maßnahmen Anwendung finden. SCHÄFER vertritt die recht plausible Ansicht, daß die Hopfeninhaltsstoffe durch lange Hydrolyse im alkalischen Bereich chemisch verändert werden, und der daraus resultierenden Abbau- oder Umwandlungsprodukten, nicht aber den nativen Inhaltsstoffen die östrogene Wirksamkeit zuzuschreiben sei. SCHÄFER vermutet, daß es sich bei dem östrogenen Prinzip des Hopfens um eine additive Wirkung mehrere Stoffe handeln könne. Er fand unter den chemischen Umwandlungsprodukten das Isoxanthohumol, bzw. das mit Isoxanthohumol im chemischen Gleichgewicht stehende Xanthohumol östrogen wirksam. Ein östrogen wirksames Sterin konnte er im Hopfen nicht auffinden. Es ist beachtenswert, daß SCHÄFER, wie auch andere Autoren, nicht alle untersuchten Hopfensorten wirksam fand, sondern nur sehr wenige, und daß beim biologischen Testversuch nur jeweils ein Teil der eingesetzten Tiere positiv reagierten und dies häufig nur an der Grenze der Nachweisbarkeit. Da SCHÄFER seine Untersuchungen gleichzeitig mit uns begann, werden wir auch noch im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit darauf Bezug nehmen.

II

EIGENE EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

Im ersten Kapitel der vorliegenden Arbeit habe ich einen Überblick über die vorhandene Phytoöstrogen-Literatur gegeben. Er erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit, da ständig weitere Arbeiten zum Thema erscheinen - häufig in schwer zugänglichen Zeitschriften - aber es geht aus ihm hervor, daß auf dem gesamten Gebiet viele Unklarheiten und Widersprüche vorliegen.

In Anbetracht des allgemeinen theoretischen Interesses, aber auch der hier und dort angeschnittenen Fragen von praktischer Bedeutung, habe ich auf Anregung von Herrn Dr.phil. Dr.med. H.BAYERLE, Leiter der Chemischen Abteilung im Pathologischen Institut der Universität München, eigene experimentelle Untersuchungen angestellt. Pflanzliche Substanzen oder Zubereitungen aus Pflanzen mehr oder minder bekannter chemischer Struktur, deren phytoöstrogene Effekte in der Weltliteratur beschrieben sind, wurden einer Prüfung im Tierversuch unterzogen. Die Substanzen verdanke ich Herrn Dr.rer. nat. F.GRANDEL und Herrn Diplomchemiker H.NEUMANN, Firma Keimdiät GmbH Augsburg, durch deren Arbeitsteam diese Substanzen hergestellt oder beschafft werden konnten. Bei der Aufarbeitung des pflanzlichen Ausgangsmaterials wurde meist die Methode BUTENANDT[5)] angewandt, nach welcher, wie oben erwähnt, erstmals ein

Phytoöstrogen aus Palmkernrückständen isoliert wurde. Ihr Prinzip sei kurz dargelegt: Die Materialien wurden mit heißem Methanol mehrmals extrahiert. Aus dem gereinigten Extrakt wurde nach Zentrifugieren das Methanol abdestilliert. Der Rückstand wurde wieder in Methanol aufgenommen und Ungelöstes abfiltriert. Nach weiterem Verdampfen des Lösungsmittels erhielt man einen Rohextrakt, der mit methanolischer Kalilauge hydrolysiert wurde. Nach Einengung des Volumens wurde angesäuert und mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wurde mit verdünnter Soda-Lösung ausgeschüttelt und eingedampft. Die zurückbleibenden Öle wurden im Tierversuch auf Wirksamkeit geprüft.

Ergebnisse stehen und fallen mit der Methode, mit der sie erzielt werden. Es scheinen viele zweifelhafte Ergebnisse auf einer kritiklos angewandten Methode zu beruhen. Ich bringe im nachfolgenden Abschnitt eine Zusammenfassung der meist angewandten Untersuchungsverfahren.

1. ALLEN-DOISY-Test: Dieser ist der einzig spezifische, allgemein anwendbare und auch anerkannte Test. Er beruht auf der Veränderung der Zellqualität des Scheidenabstriches bei den zu vaginalen Brunsterscheinungen befähigten Nagerweibchen und wurde 1923 von ALLEN und DOISY[65)] beschrieben. Ein Schema der dabei auftretenden Stadien ist nachfolgend angeführt. Es gelten folgende Kriterien (nach AMMON-DIRSCHERL[66)]):

	Diöstrus (Ruhestadium)	Proöstrus (Prolif.Phase)	Östrus (Brunst)	Metöstrus (Rückbildung)
Scheiden-schleim-haut.	Geschichtetes Epithel mit sezernierenden Schleimzellen	Zunahme der Schichtzahl, Schleimzellen sondern nicht mehr ab, werden abgestoßen. Oberste Schicht beginnt zu verhornen.	Hochgeschichtetes Epithel, Abstoßung der obersten Hornschichten	Abstoßung der oberen, von Leukozyten durchsetzten Schichten
Sekret (Abstrich)	Schleim Leukozyten, Epithelzellen	Kein Schleim, nur (kernhaltige) Epithelzellen	kernlose "Schollen" (verhornte Epithelzellen)	Leukozyten, Epithelzellen, Schollen

Der Test ist nur dann zuverlässig, wenn man mit infantilen oder ovarektomierten Tieren arbeitet. Da auch bei diesen ziemlich große Schwankungen vorkommen (ohne Behandlung), muß ein deutliches Überwiegen von kernhaltigen Epithelzellen und kernlosen Schollen für ein positives Ergebnis gefordert werden. Die Schollen, wie sie vor allem im Vollöstrus des normalen geschlechtsreifen Nagerweibchens und beim ovarektomierten Tier nach Injektion eines tierischen Östrogens auftreten, sind eckig, farblos, oder leicht bläulich schimmernde, an Eisschollen erinnernde Gebilde, die sich aus Epithelzellen entwickeln. Charakteristisch ist also die Form und der Effekt, daß sie Farbstoffe im allgemeinen nicht, oder nur sehr wenig annahmen.

Es ist bekannt, daß bei Vitamin A-Mangel ein mehr oder weniger gehäuftes Auftreten von scholligen Gebilden bei ovarektomierten Tieren vorkommen und ein positives Ergebnis vortäuschen kann. Deshalb sollte man auf ausreichende Zufuhr von Vitamin A achten. Aber selbst dann können diese, von mir als Pseudoschollen bezeichneten Gebilde, nicht immer ausgeschaltet werden. Die Pseudoschollen unterscheiden sich von den "echten" Schollen in Form und Anfärbbarkeit. Sie zeigen nicht die typischen eckigen Formen, sondern sind bei großer Variation in Größe und Gestalt abgerundet. Sie färben sich manchmal mit rotem, ein anermal mit blauem Farbstoff an. Es ist schwer, etwas über ihre Herkunft auszusagen. Ich gewann den Eindruck, es könnte sich um Kernmaterial aus Leukozyten oder von Epithelzellen stammend handeln. Dabei wäre

es denkbar, daß einerseits mechanische Momente mitspielen, etwa die Ausführung des Scheidenabstriches, bzw. die momentane mechanische Resistenz der Sekretbestandteile, andererseits - und das erscheint wahrscheinlicher - daß Epithelzellen, die auch beim ovarektomierten Tier in relativ großer Zahl vorkommen können, sich nicht in Schollen umwandeln, sondern degenerieren, indem zuerst das Zellplasma zugrunde geht, dann sich die Kerne zusammenballen unter morphologischen und chemischen Veränderungen. Zu letzterer Überlegung kam ich deshalb, weil häufig Epithelzellen mit sehr kleinem Zellplasma vorkommen, die an Lymphozyten erinnern, aber etwas größer sind als diese. Das wäre dann ein Vorstadium zur Bildung von "Pseudoschollen". Bei Injektion eines tierischen Östrogens verschwinden Pseudoschollen.

Uterusgewichtstest: Es werden hierbei meistens das Frischgewicht des Uterus eines behandelten Tieres mit dem eines gleichaltrigen unbehandelten verglichen. Einige Untersucher ziehen den Vergleich der Trockengewichte vor. Andere begnügen sich mit einer Längenmessung, ja sogar mit einem makroskopischen Vergleich, wobei dann als Maßbezeichnung + bis ++++ usw. dienen. Die Methode ist nicht spezifisch für östrogene Wirkungen, denn viele andere Objekte, z.B. Hoden- und Eierextrakte (FELLNER[67]) oder Leberextrakte (SCHRÖDER und GOERBIG[68]) wirken wachstumsfördernd auf den Uterus. Der Test wurde von BÜLBRING und BURN[69]) 1935 angegeben. TOBIAS[70]) schlug eine Kombination mit dem ALLEN-DOISY-Test vor, weil der Uterusgewichtstest für quantitative Aussagen besser geeignet sei. Die Erfahrung lehrt jedoch, daß die Ausführung der Uteruswägungen auf erhebliche technische Schwierigkeiten stößt.

3. Histologische Untersuchung der Vaginal- und Uteruswandung: Diese Methode dürfte recht aufschlußreich sein, wenn auch wenig geeignet für umfassende Wirksamkeitsprüfungen.
4. Auslösung des Östrus an kastrierten Affen.
5. Beeinflussung von Struktur und Sekretion des Hypophysenvorderlappens.
6. Gonadotrope Wirkung bei hypophysektomierten Tieren.
7. Messung der Mammillenlänge und histologische Untersuchung der Prostatadrüsenstücke und der bulbourethralen Drüsen bei männlichen Schafen und Meerschweinchen.
8. Verhinderung der Uterusatrophie bei ovarektomierten Schafen.
9. Auslösung von Endometriumcysten und Fruchtbarkeitsstörungen.

Nach den in unserem Laboratorium vorliegenden Erfahrungen ist die beste, weil spezifischste und allgemein anwendbare Methode der Wirkungsprüfung von Phytoöstrogenen, die Vaginalabstrichuntersuchung am ovarektomierten Tier nach ALLEN-DOISY.

Versuchstiere waren bei uns ausschließlich weiße Ratten im Gewicht von ca. 100 g, die beiderseits ovarektomiert wurden und erst dann Anwendung fanden, wenn über zwei Wochen nach dem Eingriff kein Östrus entwickelt wurde, sondern reines Ruhestadium vorlag. Da meine experimentellen Untersuchungen sich über mehr als ein Jahr hinzogen, hatte ich reichlich Gelegenheit, sämtliche Variationen

und Feinheiten des Vaginalabstriches zu studieren, bei jungen und älteren, bei behandelten und unbehandelten Tieren, insbesondere in bezug auf die Beurteilung positiver und negativer Ergebnisse. Dieser Hinweis ist notwendig, da aus der Literatur hervorgeht, daß viele Autoren in der Bewertung zweckbetont optimistisch sind. Die Applikation der Substanzen nahmen wir in verschiedenen Dosierungen vor, teils oral, teils subkutan oder intramuskulär. Im Falle negativer Ergebnisse wurden die verabreichten Mengen erhöht oder die Applikationsweise variiert oder mehrfach in entsprechenden Zeitintervallen wiederholt, wobei Verträglichkeitsprüfungen im Vorversuch angestellt wurden. In manchen Fällen wurden die Fütterungsversuche über mehrere Wochen hin ausgedehnt. Die Scheidenabstriche wurden mehrfach vorgenommen, um einen positiven Ausfall nicht zufällig zu übersehen.

Von den vielen in der Literatur als östrogen wirksam angegebenen Pflanzenstoffen, haben wir uns bei den eigenen Untersuchungen zuerst mit den aus Hopfen herstellbaren Extraktivstoffen beschäftigt, vorwiegend aus zwei Gründen:
Erstens gehört, wie aus unserer Darstellung auf Seite 46 hervorgeht, Hopfen zu den meist untersuchten Pflanzen, und zweitens sind die Extraktstoffe relativ mannigfaltig und leicht zugänglich.

Versuch 1 a):

Fütterungsversuch mit Hopfentotalextrakt:

Als Ausgangsmaterial dienten frische Hopfendolden, die eine Ausbeute von 39 % Hopfentotalextrakt lieferten, gewonnen nach BUTENANDT und JACOBI[5]. Der gesamte ätherfreie Extraktionsrückstand wurde zu 1 % mit Milchzucker verrieben.

Versuchsdauer: 15 Tage

Ausführung: Die Substanz wurde mit Grundnahrung (Preßfutter Muskator) gemischt. Vier ovarektomierte Ratten bekamen fünf Tage lang je 6 g der Substanz, entsprechend 0,06 g Totalextrakt und 0,156 g Hopfendolden mit Grundnahrung verfüttert.

Ergebnis: Die vom 5. bis 15. Tag täglich durchgeführten Vaginalabstriche zeigten gegenüber Leerabstrichen eine relative Zunahme der Epithelzellen und uncharakteristische schollige Gebilde, die den Schollen eines regelrechten, durch Östradiolinjektion erzeugten Schollenstadiums, nur ähnelten. Dies war allerdings nur bei zwei von vier Tieren der Fall. Spätere Untersuchungen sollten jedoch ergeben, daß solche Bilder auch innerhalb der "physiologischen" Schwankungsbreite der Vorgänge an der Vaginalschleimhaut bei ovarektomierten Tieren anzutreffen sind. Sie veranlaßten mich indes zu zwei Wiederholungen des Versuches.

Versuch 1 b):

Versuchsdauer: 6 Tage

Ausführung: Vorgehen prinzipiell wie bei 1 a. Drei ovarektomierte Ratten erhielten sechs Tage lang insgesamt je etwa 20 g der Substanz, entsprechend 0,2 g

Totalextrakt und 0,52 g Hopfendolden. Der ursprüngliche Plan, den Tieren die doppelte Menge pro Tag und Tier zuzuführen, scheiterte, da größere Mengen nicht angenommen wurden (Bitterstoffe?).

Ergebnis: Eines der Tiere zeigte im Abstrichbild reinen Diöstrus, die beiden anderen wiesen wiederum einige Epithelzellen und uncharakteristische schollige Gebilde auf.

Versuch 1 c):

Versuchsdauer: 13 Tage

Ausführung: prinzipiell wie bei 1 a und 1 b. Vier ovarektomierte Ratten erhielten neun Tage lang je 5 g der Substanz, das 0,05 g Totalextrakt und 0,13 g Hopfendolden entspricht.

Ergebnis: Bei allen Tieren fanden sich uncharakteristische schollige Gebilde, manchmal relativ viele Epithelzellen; Leukozyten konnten fehlen oder in größeren oder kleineren Mengen vorhanden sein.

Gesamtbeurteilung des Versuches:

Die Forderung eines reinen Schollenstadiums oder eines Bildes mit großem Überwiegen von richtigen Schollen, wie man sie nach Injektion eines tierischen Östrogenpräparates findet, war nicht erfüllt. Es wurde gleichzeitig gleichaltrigen ovarektomierten Ratten 10 Gamma Östradiol in öliger Lösung injiziert. Bei allen vier Tieren trat nach drei oder vier Tagen Vollöstrus auf.

Versuch 2:

Langzeitfütterungsversuch mit Hopfentotalextrakt.

5 % Hopfentotalextrakt wurde mit 95 % Milchzucker verrieben.

Versuchsdauer: 33 Tage.

Ausführung: Die Substanz wurde der Grundnahrung wie bei Versuch 1 zugesetzt. Acht Tiere bekamen 32 Tage lang je insgesamt rund 135 g der Substanz verabreicht.

Ergebnis: In den Abstrichen konnte eine Zunahme der Epithelzellentwicklung festgestellt werden. Die "Epithelzellnester" zerfielen jeweils in den folgenden Tagen. Die Schollenentwicklung war gering. Vollöstrus wurde in keinem Fall beobachtet.

Versuch 3:

Langzeitversuch mit kombinierter Fütterung und subkutaner Verabreichung.

20 % Hopfentotalextrakt wurde mit 80 % Kürbiskernöl gemischt.

Versuchsdauer: 25 Tage.

Ausführung: Vier ovarektomierten Ratten wurde vom 1. bis zum 4. Tag täglich je 1 ccm der Lösung, vom 7. bis zum 9. Tag und am 11. Tag je 0,5 ml subkutan injiziert. Anschließend wurde die Substanz denselben Tieren gefüttert. Vom 14. bis zum 17. und vom 21. bis zum 24. Tag wurde täglich je 2 ccm, am 18. Tag 3 ccm zugeführt.

Ergebnis: Trotz der hohen Substanzkonzentrationen fanden sich während der ganzen Zeit in den Abstrichen nur vereinzelt Epithelzellvermehrung, aber kein einziges Mal eine Anreicherung von Schollen. Fast in jedem Abstrich waren Leukozyten vorhanden.

Versuch 4 a):

Verwendung von Hopfenöl - subkutane Verabreichung.

10 Teile ätherisches Hopfenöl wurden mit 90 Teilen Kürbiskernöl gemischt.

Versuchsdauer: 12 Tage

Ausführung: Drei ovarektomierten Ratten wurde am ersten Versuchstag 2 ccm der Lösung, entsprechend 0,2 ccm Hopfenöl, subcutan injiziert, am zweiten je 4 ccm, entsprechend 0,1 ccm Hopfenöl und am vierten 0,5 ccm, entsprechend 0,05 ccm Hopfenöl.

Ergebnis: In den Abstrichen überwogen durchweg die Leukozyten.

Versuch 4 b):

Ätherisches Hopfenöl in Kürbiskernöl - subcutane Verabreichung.

2 Teile Hopfenöl wurden mit 18 Teilen Kürbiskernöl gemischt.

Versuchsdauer: 12 Tage

Ausführung: An den 3 ersten Versuchstagen subcutane Injektion von je 1 ccm der Lösung, entsprechend 0,1 ccm Hopfenöl, bei 3 ovarektomierten Ratten; am 4. und 5. Tag Injektionen von je 0,5 ccm, entsprechend 0,05 ccm Hopfenöl pro Tier und Tag.

Ergebnis: In den Abstrichen fanden sich teilweise schollige Gebilde, kein Vollöstrus. Im übrigen überwogen die Leukozyten.

Versuch 4 c):

1 % Hopfenöl in Milchzucker - Fütterungsversuch.

Die Hopfenausbeute von 0,85 % stammte aus der Holletauer Hopfenernte von 1962. Das Öl wurde zu 1 % mit Milchzucker verrieben.

Versuchsdauer: 13 Tage

Ausführung: Wie bei früheren Versuchen wurde die Substanz der üblichen Grundnahrung zugesetzt. Vier ovarektomierte Ratten bekamen 6 Tage lang je 5 g Substanz, was 0,05 g Öl und 0,5 g Hopfendolden entspricht, ins Futter gemischt.

Ergebnis: Im Vaginalabstrich fanden sich Leukozyten, teilweise Epithelzellen und uncharakteristische schollige Gebilde, kein Vollöstrus. Von einem gesicherten phytoöstrogenen Effekt kann daher auch hier nicht gesprochen werden.

Versuch 4 d):

5 g Hopfenextrakt in 50 ccm Kürbiskernöl - subcutane Verabreichung.

Versuchsdauer: 12 Tage

Ausführung: Am ersten Tag Injektion von je 2 ccm der Lösung, entsprechend 0,2 g Hopfenextrakt, an 3 Tieren, am 3. Tag je 1 ccm, entsprechend 0,1 g Hopfenextrakt und am 5. Tag je 0,5 ccm entsprechend 0,05 g Hopfenextrakt.

Ergebnis: Am achten Versuchstag waren im Abstrich von 2 Tieren relativ viele Epithelzellen zu finden, ansonsten Diöstrus.

Bei unseren Versuchsreihen 1 bis 4 haben wir Totalextrakte von Hopfendolden oder Hopfenölen verwendet. In den Untersuchungen der neueren Zeit haben viele Autoren umfangreiche Versuche zur Isolierung einzelner chemisch definierter Stoffe verschiedener Stoffklassen mit fraglicher östrogener Wirksamkeit unternommen. So hat SCHÄFER[64)] in seiner Arbeit mehrere Einzelsubstanzen, u.a. ein Sterin (β-Sitosterin) isoliert, ferner eine Substanz von ganz anderer Konstitution (Isoxanthohumol), welche schon früher im Hopfen entdeckt worden war. Diese letztgenannte Substanz wurde von SCHÄFER als wirksam bezeichnet. Wir wünschten bei unseren Untersuchungen ebenfalls reine, chemisch definierte Substanzen zu verwenden und untersuchten die uns zur Verfügung stehende Substanz Lupulin und Lupulensäure, hergestellt durch Prof.Dr.REINDL, Weihenstephan und durch Herrn NEUMANN übermittelt.

Versuch 5 a):

Lupulinauszug in Kürbiskernöl - subcutane Verabreichung.

Versuchsdauer: 12 Tage

Ausführung: Am ersten Versuchstag wurde zwei ovarektomierten Tieren je 2 ccm der Lösung, entsprechend 0,5 g Lupulin, injiziert, am 3. nochmals je 1 ccm und am 4. Tag je 1/2 ccm. Mehr war mit dem Leben der Tiere nicht vereinbar.

Ergebnis: Die Abstrichuntersuchungen, die laufend durchgeführt wurden, blieben unauffällig.

Versuch 5 b):

Lupulensäure - subcutane Verabreichung.

Versuchsdauer: 10 Tage

Ausführung: Sechs ovarektomierte Ratten bekamen drei Tage lang je 0,5 g der Substanz, entsprechend 2 mg reine Lupulensäure, injiziert.

Ergebnis: Die laufend durchgeführten Abstrichuntersuchungen zeigten kein anderes Bild als bei unbehandelten Tieren. Damit ist erwiesen, daß die Hopfeninhaltsstoffe vom Typ Lupulensäure in reinem Zustand keine Östrogenwirkung aufweisen.

In Übereinstimmung mit den nach Abschluß der eigenen Untersuchungen bekanntgewordenen Ergebnisse von SCHÄFER finden wir also entgegen Aussagen der Autoren KOCH, HEIM und HEILMANN keine, oder bei Anlegung eines strengen Maßstabes, nur angedeutete östrogene Effekte in Hopfenpräparationen. Unterschiedliche, manchmal positive, manchmal negative Effekte bei den Untersuchungen von SCHÄFER werden von diesem Autor als botanische Besonderheit, als Merkmal bestimmter Hopfenrassen angesehen, außerdem auch als additive Wirkung verschiedener, chemisch unterschiedlicher Stoffgruppen und möglicherweise nicht als Wirkung nativer Stoffe, sondern von chemischen Umwandlungsprodukten.

Nachdem wir uns im Vorliegenden mit der Wirkung von Hopfeninhaltsstoffen beschäftigt haben, berichten wir nachfolgend über unsere Versuche mit Extrakten aus einer Grassorte, die zu den wesentlichen Bestandteilen von Viehweiden gehören kann und nach SCHOOP, KLETTE und vielen anderen als Ursache für östrogene Wirkungen

bei Weidetieren gelten könnte. Es handelt sich um das Welsche Weidelgras. Nach SCHOOP[36] sind Extrakte daraus wirksam.

Wir untersuchten wieder bei ovarektomierten Ratten die Wirkung von Extrakten, hergestellt nach BUTENANDT und JACOBI[5], welche teils injiziert, teils im Langzeitversuch verfüttert wurden. Das Gras wurde in Reinkultur im Feldbau bezogen und die daraus gewonnenen Präparate kurze Zeit nach Aufarbeitung im Tierversuch verwendet.

Versuche mit Welschem Weidelgras

Versuch 6 a):

Langzeitfütterung mit Weidelgrasextrakt.

Die frisch geernteten Gräser wurden mit Methanol extrahiert. Die Ausbeute betrug dabei etwa 10 %. 5 Teile Grasextrakt wurden mit 95 Teilen Milchzucker verrieben.

Versuchsdauer: 28 Tage

Ausführung: Die Substanz wurde der Grundnahrung zugesetzt und verfüttert. 16 Tiere bekamen über einen Zeitraum von 24 Tagen je insgesamt etwa 45 g Substanz verabreicht, entsprechend 2,25 g Grasextrakt und 22,5 g frischem Gras. Vaginalabstriche wurden fortlaufend angefertigt und beurteilt.

Ergebnis: Der Versuch ist zusammenfassend folgendermaßen zu beurteilen: Die meisten Tiere boten Bilder wie bisher, Diöstrus oder weit häufiger vielfach schollige Gebilde, die ich als Pseudoschollen bezeichne. Bei 7 Tieren fanden sich in den Abstrichen viele Epithelzellen

neben Schollen und mehr oder minder vielen Leukozyten, besonders ausgeprägt nach 21 Tagen Verfütterung. Bei einem Tier waren am 24. Tag nach Beginn des Versuches Epithelzellen und Schollen im Abstrich derart vorherrschend, daß ein Übergang von Proöstrus in Vollöstrus anzunehmen war. Keines der Tiere entwickelte ein reines Schollenstadium. Eine Erscheinung muß Erwähnung finden, nämlich das häufige Auftreten leukozytenähnlicher Gebilde, die sich bei näherer Betrachtung als Epithelzellreste deuten liessen. Diese Gebilde fanden sich immer dann, wenn vorher viele Epithelzellen im Bild gewesen waren. Es ließ sich beobachten, daß das Plasma der Epithelzellen schrumpfte und allmählich ganz verschwand; zurück blieben die dazugehörigen Kerne. Anstatt also, daß die Kerne verschwunden wären und Epithelzellen sich in Schollen umgewandelt hätten, erfolgte zum größeren Teil der umgekehrte Weg. Nur ein kleinerer Teil der Zellen ging in die kernlosen Schollen über. Dabei treten, von wenigen Ausnahmen abgesehen, Leukozyten auf, die bei genauer Betrachtung von Epithelkernen meist zu unterscheiden waren. Eine Verwechslung mit Lymphozyten ist grundsätzlich leicht möglich, jedoch findet man neben diesen Gebilden kleine Epithelzellen mit wenig Plasma, die darauf hindeuten, daß es sich nicht um Lymphozyten handelt. Da die weitere Erfahrung lehrte, daß die Zahl der Epithelzellen, die bei unbehandelten ovarektomierten Ratten auftreten können, erheblichen Schwankungen unterworfen ist, ist die strenge Forderung nach einem eindeutigen Schollenstadium, ohne welches von einem gesicherten phytoöstrogenen Effekt nicht gesprochen werden sollte, gerechtfertigt. Der Einwand, daß unvollständige Ovarektomie für die Erscheinungen verantwortlich sein

könnte, läßt sich damit widerlegen, daß, von eventuell vorgenommener Behandlung unabhängig, nach wochenlang bestehendem Diöstrus im Abstrich plötzlich ziemlich viele Epithelzellen und auch Schollen auftreten können, die dann wieder verschwinden. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt.

Versuch 6 b):

2. Fütterungsversuch mit Grasextrakt.

Im folgenden Versuch wurde der Extrakt in höherer Konzentration gefüttert. Die Gräser waren, wie im vorhergehenden Versuch, mit Methanol vorbehandelt worden. Die Ausbeute des gewonnenen Extraktes betrug wiederum etwa 10 %. 10 Teile Grasextrakt wurden mit 90 Teilen Milchzucker verrieben.

Versuchsdauer: 11 Tage

Ausführung: Vier ovarektomierte Ratten erhielten über fünf Tage zusammen je etwa 12 g der Substanz, was ebenfalls 12 g frischem Gras und 1,2 g Grasextrakt entspricht, der Grundnahrung zugesetzt.

Ergebnis: In den angefertigten Vaginalabstrichen fanden sich wechselweise Bilder von reinem Diöstrus und mit scholligen Gebilden neben unterschiedlichen Mengen von Leukozyten und Epithelzellen.

Versuch 6 c):

Injektionskur mit Grasextrakt.

Versuchsdauer: 10 Tage

Ausführung: Vier Ratten wurde fünf Tage lang je 0,5 ccm der Substanz subcutan injiziert. Vom dritten Tag an ging an den Injektionsstellen das Fell ab und die Haut da-

runter verhärtete sich beträchtlich.

Ergebnis: In den angefertigten Vaginalabstrichen überwogen durchweg die Leukozyten. Die vielfach auftretenden scholligen Gebilde waren teilweise stark mit Leukozyten durchsetzt.

Anschließend wurde ein Extrakt aus Welschem Weidelgras getestet, der in Kürbiskernöl ausgezogen war und zwar waren 20 Teile Grasextrakt, der wie oben beschrieben, durch Methanolbehandlung aus frischem Gras in etwa 10 %iger Ausbeute gewonnen worden war, mit 80 Teilen Kürbiskernöl bei 50°C digeriert worden. Das Kürbiskernöl war dann von den unlöslichen Teilen des Grasextraktes abfiltriert und für den Test verwendet worden.

Versuch 6 d):

Grasextrakt in Kürbiskernöl ausgezogen - subcutane Verabreichung.

Versuchsdauer: 12 Tage

Ausführung: Am ersten Tag wurde zwei ovarektomierten Tieren 2 ccm der öligen Flüssigkeit subcutan injiziert, am zweiten und dritten Tag je 1 ccm und am fünften Tag je 1/2 ccm.

Ergebnis: Alle angefertigten Abstriche blieben unauffällig.

Versuch 6 e):

Grasextrakt in Kürbiskernöl ausgezogen - Fütterungsversuch.

Versuchsdauer: 10 Tage

Ausführung: Die ölige Flüssigkeit wurde mit Muskator gemischt und gefüttert. Drei Tiere bekamen fünf Tage lang je 3 ccm der Substanz in das Futter gemischt.

Ergebnis: Die angefertigten Abstriche blieben wiederum unauffällig.

Aus unseren vorliegenden Versuchen, insbesondere den langfristigen Fütterungsversuchen mit Konzentraten, geht hervor, daß das Welsche Weidelgras entgegen den Beobachtungen anderer Untersucher keine beachtenswerten Östrogeneigenschaften bei der Ratte zeigt, es sei denn, man läßt den eindeutigen Erfolg bei einem einzigen Tier als positives Ergebnis gelten. SCHOOP und Mitarb. messen dieser Pflanzenart, die einen wichtigen Bestandteil der Weideflora darstellt, eine besondere Bedeutung als Ursache und Quelle von Störungen der Fertilität bei Weidetieren bei. Die Überlegung drängt sich auf, ob möglicherweise die von SCHOOP angenommene Östrogenwirkung der Pflanze nicht pflanzlichen, sondern tierischen Ursprungs sei, weil die Futterpflanze entweder mit tierischen Östrogenen "verunreinigt" oder Östrogenen aus tierischen Ausscheidungen aufnehmen, speichern oder anreichern würden. So lag es nahe, im Laboratoriumsversuch und anschließend im Feldversuch zu prüfen, ob Pflanzen mit den Wurzeln reines Östradiol aufnehmen und im grünen Teil speichern können oder ob von Pflanzen frisch gedüngter Weiden verstärkt Phytoöstrogenwirkungen ausgehen. Die entsprechenden Versuche wurden wie nachfolgend beschrieben durchgeführt:

1. Weizenkörner wurden angekeimt und die Wurzeln fortlaufend mit östradiolhaltigem Gießwasser versehen bis die grünen Pflanzenteile etwa 20 cm Länge erreicht hatten.

Dann wurden die grünen Halme oberhalb der Wurzeln abgeschnitten und schnell getrocknet. Das Trockenmaterial, also Heu, wurde mit Preßfutter gemischt, an ovarektomierte Ratten gefüttert, die dann fortlaufen nach ALLEN-DOISY getestet wurden.

2. Im Feldversuchen wurden frisch gepflügte Flächen mit einheitlichen Pflanzen - eben Welschem Weidelgras - besät und anschließend ein Teil der Fläche mit Jauche aus Ställen trächtiger Kühe gedüngt. Ein anderer Teil diente zur Kontrolle. Als die Gräser eine entsprechende Halmhöhe erreicht hatten, wurde gemäht, das Gras nach BUTENANDT und JACOBI[5] aufgearbeitet und der Extrakt, wie oben beschrieben, an ovarektomierten Ratten verabreicht und Vaginalabstriche nach ALLEN-DOISY[65] untersucht.

Versuch 7 a):

Welsches Weidelgras, in östradiolhaltigen Nährlösungen im Laboratoriumsversuch gezogen, getrocknet und gemahlen - Fütterungsversuch.

Versuchsdauer: 39 Tage

Ausführung: Vier ovarektomierte Ratten erhielten bis zum 37. Versuchstag täglich je rund 0,5 g der Substanz mit Grundnahrung gemischt gefüttert.

Ergebnis: Die angefertigten Abstriche blieben unauffällig. (Die Östradioldüngung reichte jedenfalls nicht aus, um, per os zugeführt, eine erkennbare östrogene Wirkung zu erzeugen. Das getrocknete und gemahlene Gras selbst war inaktiv.)

Versuch 7 b):

Extrakt aus Welschem Weidelgras, im Freilandversuch erzeugt, ohne Düngung - Fütterungsversuch.

Versuchsdauer: 39 Tage

Ausführung: Fünf ovarektomierte Ratten erhielten bis zum 37. Versuchstag täglich je rund 5 g der Substanz mit Grundnahrung gemischt gefüttert.

Ergebnis: Die Abstriche der Tiere seien einzeln besprochen:

1. Tier: Vor Versuchsbeginn wurden vier Leerabstriche angefertigt. Davon zeigten die ersten drei reinen Diöstrus, im vierten fanden sich relativ viele Schollen. Alle Abstriche während des Versuches lieferten keine sicheren Anhaltspunkte für eine phytoöstrogene Wirkung. Am letzten Versuchstag lag jedoch einwandfreier Proöstrus vor.

2. Tier: Alle vier Leerabstriche vor Versuchsbeginn zeigten reinen Diöstrus. Am 36. Versuchstag waren viele Epithelzellen und Schollen im Abstrich, jedoch lag kein eindeutiger Proöstrus vor wie beim ersten Tier am letzten Versuchstag. Am 32. und 39. Versuchstag fand sich viel lymphozytenähnliches Material im Abstrich, das von Epithelzellen herstammen schien. Die übrigen Abstriche waren unauffällig.

3. Tier: Alle vier Leerabstriche vor Versuchsbeginn zeigten reinen Diöstrus, manchmal mit Pseudoschollen. Am 10. und 15. Versuchstag waren sehr viele Epithelzellen und Schollen im Abstrich, dazwischen am 12. Versuchstag Diöstrus (Versuch einer Zyklusausbildung?). Bis zum Schluß des Versuches wechselten sich Bilder mit vielen Epithelzellen und Schollen und mit Diöstrus ab. Volles

Schollenstadium oder Bilder mit ausschließlich Epithelzellen und Schollen kamen nicht vor.

4. Tier: Alle vier Leerabstriche vor Versuchsbeginn zeigten reinen Diöstrus, manchmal mit Pseudoschollen. Die Abstriche während des Versuches blieben unauffällig.

5. Tier: Wie 4. Tier.

Versuch 7 c):

Extrakt aus Welschem Weidelgras, im Freilandversuch erzeugt mit Düngung - Fütterungsversuch.

Versuchsdauer: 39 Tage

Ausführung: Vier ovarektomierte Ratten erhielten bis zum 37. Versuchstag täglich je rund 5 g der Substanz mit Grundnahrung gemischt gefüttert.

Ergebnis: Bei drei der vier Tiere waren die Abstriche vor und während des Versuches unauffällig. Ein Tier zeigte im letzten Leerabstrich ziemlich viele Epithelzellen und Schollen. Während des Versuches: am 7. Versuchstag Proöstrus, am 9. Versuchstag fast Vollöstrus, in den folgenden Tagen Diöstrus, am 14. Versuchstag ziemlich viele Epithelzellen und Schollen; dann bis zum Ende des Versuches Diöstrus.

Zusammenfassende Beurteilung der Versuche 7 a, b, c:

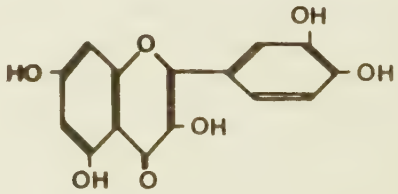
In allen drei Fällen handelt es sich um Welsches Weidelgras. Das Material von Versuch 7 a und 7 c war mit sicher östrogenhaltigem flüssigem Dünger behandelt worden. Versuch 7 a war jedoch bei allen Tieren negativ,

Die Behandlung der Futterpflanzen bei Versuch 7 c rief nur bei einem von vier Tieren einen Effekt hervor, und zwar nur ein einziges Mal während fünf Wochen. In der Gesamtbeurteilung ist der Effekt nicht größer als im Versuch 7 b, der zur Kontrolle diente. Eine gewisse Wirkung kann somit angenommen werden, jedoch ist das Ergebnis im ganzen unbefriedigend. Der Versuch 7 a hatte ein negatives Ergebnis. Hier könnte aber auch angenommen werden, daß die den Pflanzen mit dem Gießwasser angebotenen Hormonmenge nicht ausreichte.

Die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Versuche wurden mit Ausnahme von Lupulin und Lupulensäure mit Totalextrakten aus verschiedenen Pflanzen durchgeführt. In den nächsten Abschnitten berichten wir über eigene Versuche aus angeblich wirksamen Pflanzen. Es blieb jedoch offen, ob in der einen oder anderen Pflanzenart nicht auch mehrere wirksame Stoffe vorhanden sein könnten. Die Substanzen, die uns zur Verfügung standen, sind folgende:

1. Quercetin
2. Santal
3. Genistein
4. Cafestol
5. Serotonin-Kreatinin-Sulfat

1. Quercetin ist ein Flavonderivat, Seine Konstitutionsformel sieht wie folgt aus:



Quercetin

Es kommt glykosidisch verknüpft in vielen Pflanzen vor, so auch in Hopfen, Tee, in den Blüten des Goldlacks, des Stiefmütterchens und vielen anderen.

Versuch 8:

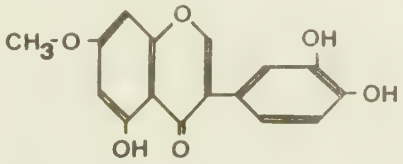
Quercetin - subcutane Verabreichung.

Versuchsdauer: 8 Tage

Ausführung: Am ersten Tag wurde vier ovarektomierten Ratten 2 ccm der Substanz subcutan verabreicht. Zwei Tiere waren am nächsten Tag tot, die beiden anderen erhielten noch zwei Tage lang die Dosis injiziert.

Ergebnis: Die Abstrichuntersuchungen zeigten durchweg Oestrus.

2. Santal ist ein Isoflavonderivat. Seine Konstitutionsformel sieht wie folgt aus:



Santal

Versuch 9 a):

1 %ige Santallösung - subcutane Verabreichung.

Versuchsdauer: 8 Tage

Ausführung: Vier ovarektomierten Ratten wurde zwei Tage lang je 2 ccm der Lösung subcutan injiziert. Eines der

Tiere wurde am dritten Tag tot aufgefunden.

Ergebnis: Die angefertigten Vaginalabstriche waren durchwegs unauffällig.

Versuch 9 b):

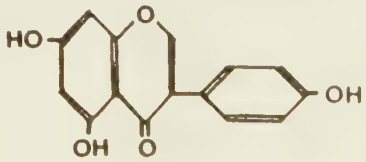
Santal sauer und alkalisch aufgeschlossen - Fütterungsversuch.

Versuchsdauer: 10 Tage

Ausführung: Die Substanz wurde in drei Dosierungen mit Grundnahrung verabreicht. Vier Tiere erhielten dreimal in zweitägigen Abständen je 1 g der Substanz, vier weitere Tiere erhielten zur selben Zeit jeweils 2 g und weitere vier Tiere je 3 g.

Ergebnis: Die angefertigten Abstriche blieben unauffällig.

3. Genistein ist ebenfalls ein Flavonderivat. Seine Konstitutionsformel sieht wie folgt aus:



Genistein

Sein Vorkommen in Blüten und Blättern des Färberginsters, Genista tinctoria, war namensgebend. Es konnte aus der Sojabohne, sowie wiederum aus Hopfen in bemerkenswerter Ausbeute isoliert werden. Über seine Östrogenwirkung ist viel gearbeitet worden, worauf wir im 1. Kapitel ausführlich hinwiesen. Es gilt als stärk-

ste einheitlich wirksame Substanz, jedoch ohne daß die Untersucher übereinstimmende Angaben - etwa in Mäuseeinheiten pro Substanzmenge - machen. Wir hatten Gelegenheit, eine kleine Menge reines Genistein zu untersuchen.

Versuch 10:

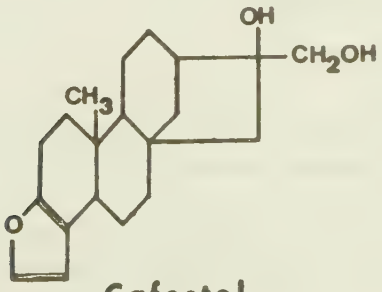
Genistein - Subcutane Verabreichung.

Versuchsdauer: 9 Tage

Ausführung: Vier ovarektomierten Ratten wurde sechs Tage lang je 1 ml der Lösung subcutan imjiziert. Vom vierten bis zum neunten Tag wurden Vaginalabstriche angefertigt.

Ergebnis: Subcutane Verabreichung einer Genisteinlösung zeigte keine Wirkung im ALLEN-DOISY-Test bei der Ratte.

3. Cafestol: Der uns zur Verfügung gestellte Stoff aus Kaffeewachs war keine Reinsubstanz. Er enthielt als Begleitstoffe Sitoserin, Stigmasterin und Dehydroisosterin. Cafestol hat folgende Konstitutionsformel.



Cafestol

Versuch 11 a):

Cafestol aus Kaffeewachs gewonnen - Fütterungsversuch.

Versuchsdauer: 15 Tage

Ausführung: Die Substanz wurde mit Grundnahrung gemischt verfüttert. Vier ovarektomierte Ratten erhielten fünf Tage lang je 5 g der öligen Substanz.

Ergebnis: Die angefertigten Vaginalabstriche zeigten reinen Diöstrus.

Versuch 11 b):

Cafestol nach BUTENANDT und JACOBI[5] extrahiert.

Versuchsdauer: 9 Tage

Ausführung: Die Substanz wurde mit Grundnahrung gemischt verfüttert. Vier ovarektomierte Ratten erhielten sechs Tage lang je 5 g. Eine größere Tagesmenge wurde von den Tieren nicht aufgenommen.

Ergebnis: Die angefertigten Vaginalabstriche zeigten uncharakteristische Gerinnsel und Leukozyten in schwankender Menge.

5. Serotonin-Kreatinin-Sulfat

Versuch 12 :

1 % Serotonon-Kreatinin-Sulfat in 99 % Milchzucker verrieben - Fütterungsversuch

Versuchsdauer: 14 Tage

Ausführung: Die Substanz wurde mit Grundnahrung gemischt verfüttert. Vier Tiere erhielten 13 Tage lang

täglich je 2,5 g.

Ergebnis: In den angefertigten Vaginalabstrichen fanden sich hauptsächlich Pseudoschollen, manchmal ziemlich viele Epithelzellen und auch Schollen. Von einer phytoöstrogenen Wirkung kann nicht gesprochen werden.

Versuch 13:

Vitamin A-Fütterung und Pseudoschollenbildung.

Das häufige Auftreten der oft erwähnten, uncharakteristischen scholligen Gebilde, die ich als Pseudoschollen bezeichnete, vor allem bei älteren, aber auch bei ganz jungen Tieren, gab Veranlassung, den nachfolgend beschriebenen Versuch durchzuführen. Die erste Feststellung war die, daß die Pseudoschollen auch bei ovarektomierten Ratten manchmal auftraten, die normales Futter erhielten und unbehandelt waren. Bei nicht ovarektomierten Ratten im geschlechtsreifen Alter fand ich dagegen keine Pseudoschollen. Führte man ovarektomierten Ratten Östradiol subcutan zu, so stellte sich Vollöstrus ein, und die Pseudoschollen verschwanden solange das Östradiol einwirkte.

HOHLWEG und FISCHL[71)] haben 1933 beschrieben, daß es bei Vitamin A-freier Ernährung zu einem "scheinbaren Daueröstrus" käme. Da nach meiner Beobachtung die Pseudoschollen bei behandelten und unbehandelten, alten und auch jüngeren Tieren auftraten, nahm ich 27 zur Verfügung stehende Tiere in den Versuch, die ein halbes Jahr vorher ovarektomiert und in der Folgezeit zu obigen Testierungen verwendet wurden.

Ich führte Vitamin A fünf Tage lang in Überdosierung zu. Das Vitamin wurde in öliger Lösung auf Brotstückchen getropft und verabreicht. 7 Tiere blieben zum Vergleich unbehandelt. Trotz der hohen Vitamin A-Gaben verschwanden die Pseudoschollen nicht. Vitamin A-Mangel war demnach nicht die Ursache dieser Kolpokeratose, sondern sie scheint hormonell bedingt gewesen zu sein.

D I S K U S S I O N

Nach Erstellung eines Berichtes über die uns zugänglich gewesene Literatur und Darlegung eigener Versuchsergebnisse handelt es sich darum einen Standpunkt zu finden, von dem aus die Unterschiede zwischen unseren eigenen Experimenten und den sehr zahlreichen Untersuchungen anderer Autoren erklärt werden können. Ein solcher Standpunkt könnte sich ergeben aus den nachfolgend formulierten Thesen.

1. Phytoöstrogene gehören chemisch den verschiedensten Stoffgruppen an, eine strukturelle Ähnlichkeit mit den "klassischen" tierischen Östrogenen kann grundsätzlich vorkommen. Die wenigsten, als östrogen wirksam bezeichneten Pflanzenstoffe, sind chemisch definiert.

2. Die geringe östrogene Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen beruht auf einem anderen Chemismus als der von tierischen Östrogenen. Auch wenn solche pflanzlichen Stoffe Sterine sind, ist ihr chemischer Umbau in Östrogene durch die Pflanzenzelle eben-

so wenig erwiesen wie etwa, um ein Beispiel aus einem anderem Gebiet anzuführen, die Bildung cancerogener Substanzen in der Tierzelle durch Cholesterin. Bei den im Tierkörper gering wirksamen Phytoöstrogenen handelt es sich um spezifische Stimulationen physiologischer Östrogenproduktion. Bekannt gewordene Schädigungen von Weidetieren nach ständigem Genuß einseitiger Pflanzenspecies, wie z.B. der Kleeart Trifolium subterraneum, beruhen vielleicht auf anderer Ursache.

3. Östrogen wirksame Stoffe aus dem Pflanzenreich enthalten nur Bruchteile der Aktivität von Östradiol. Die Messung der Wirksamkeit in Internationalen Einheiten ist fragwürdig, weil die Wirkung meist nicht erhöht wird bei höherer Dosierung oder längerer Verabreichung.

4. Zur Testung östrogener Wirkung ist die Durchführung der Vaginalabstrichuntersuchung an ovarektomierten oder infantilen Mäusen oder Ratten zu fordern. Kontrollversuche mit Östradion an ovarektomierten Nagern sind qualitativ eindeutig, quantitativ abstufbar und bei parenteraler Verabreichung fast hundertprozentig sicher. Ebenso sicher und einfach ist die Ablesbarkeit des Ergebnisses durch die mikroskopische Beurteilung. Der zeitliche Verlauf der Teste mit Östradiol ist geringen Schwankungen unterworfen. Bei oraler Verabreichung tierischer Östrogene treten Verzögerungen der verschiedenen Stadien des Diöstrus, Proöstrus und Vollöstrus auf und lassen bei der Beurteilung an Eindeutigkeit zu wünschen übrig. Solche Bilder im Abstrich sind aber auch dann noch ohne Schwierigkeit bewertbar und unvergleichlich eindeutiger als

entsprechende orale Verabreichungen, - dauernde oder einmalige - von angeblich östrogen wirksamen pflanzlichen Produkten. Das Abklingen eines positiven ALLEN-DOISY-Testes ist nach oraler Verabreichung verzögert. Die Methode der Feststellung, Messung der Vergrößerung, Wägung, Beurteilung der Vergrößerung des Uterus der Versuchstiere, ohne mikroskopisch- anatomische Kontrolle ist höchst fragwürdig und praktisch unzureichend. Sie ist ferner unspezifisch. Uterusvergrößerungen können auch, wie aus der Literatur hervorgeht, auf unterschiedlich anderen Wegen provoziert werden.

5. Die meisten in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse über eine östrogene Wirksamkeit pflanzlicher Produkte sind mit dem Verfahren der Uterusuntersuchung gewonnen und geprüft worden.

6. Die Angaben der Literatur über die Haltbarkeit der Wirksamkeit in einem Pflanzenprodukt sind sehr widersprechend. Dies ist unter Berücksichtigung der chemisch unterschiedlichen Verfahrenstechnik auch nicht anders zu erwarten. Darüber hinaus soll es bei manchen Pflanzenspezies Standortvarietäten geben (s. verschiedene Wirksamkeit von Hopfen, die sich völliger Unwirksamkeit bis zur deutlichen Nachweisbarkeit erstreckt).

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Es wurde ein literarischer Überblick über die Entwicklung des Begriffes phytoöstrogener Stoffe und deren Wirkungen im Tierkörper gegeben.

2. In eigenen Arbeiten wurden zahlreiche Pflanzenpräparate nach oraler und parenteraler Verabreichung tierexperimentell mit dem ALLEN-DOISY-Test auf östrogene Wirksamkeit geprüft. Es handelte sich dabei vorwiegend um Extrakte aus Pflanzen, die in der Literatur als besonders wirksam bezeichnet werden, wie zum Beispiel Hopfen oder die Kleeart Trifolium subterraneum, aber auch reine Substanzen von bekannter chemischer Struktur.

3. Die Brauchbarkeit des ALLEN-DOISY-Testes und anderer wurde geprüft und diskutiert.

4. Es wurde gezeigt, daß bei sicher ovarektomierten Tieren, auch vor Verabreichung östrogener Stoffe und ohne sonstige vorausgehende Behandlung, sich im Scheidenabstrich relativ viele Epithelzellen und Schollen finden können, ferner Gebilde, die keine Kernfärbung zeigen und schollenähnlich sind, ohne die bekannte charakteristische Form zu zeigen. Es wurde hierfür die Bezeichnung "Pseudoschollen" verwendet.
   Es wird der Standpunkt vertreten, daß dadurch positive Versuchsergebnisse vorgetäuscht werden können und daß zur sicheren Beurteilung "östrogen wirksam" das Stadium des sogenannten Vollöstrus ausschlaggebend ist.

5. Es wurde experimentell untersucht, ob Pflanzen aus gedüngten Wiesen und Pflanzen aus östradiolhaltigen

Wasserkulturen Östradiol direkt aufnehmen können und daraufhin östrogen aktiv werden.

6. Es wurde diskutiert, wie es in der Literatur zu widersprechenden Ergebnissen und falschen Schlußfolgerungen kommen kann und wodurch die negativen Ergebnisse bei unseren Untersuchungen zu erklären sind.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. LOEWE, S., LANGE, F. und E.SPOHR: Biochem.Z. 180 (1926), 1
2. LOEWE, S. und W.FALRE, zit.n. LOEWE, S., LNAGE F. und E. SPOHR: Biochem. Z. 180 (1926), 1
3. FRANK, Z.B.R.T. und M.A.GOLDBERG: J.Amer.Med.Ass.86 (1926), 1686
4. MUCH, H. und A.HAIM: Münch.med. Wschr. 78 (1931), 1992
5. BUTENANDT, A. und [illegible]JACOBI: Z.physiol. Chem. 218 (1933), 104
6. SKARZYŃSKI, B.: Nature 131 (1933), 766
7. VATNA, S.: Thai. Sci. Bull. 4 (1940), 3
8. SCHOELLER, W., DOHRN, M. und W.HOHLWEG: Naturw. 28 (1940), 532
9. BUTENANDT, A.: Naturw. 28 (1940), 533
10. BRADBURY, R.B. und D.E.WHITE: Vitamins and Hormones, Vol XII, 207 (1954)
11. SCHERING-KAHLBAUM, A.G., 1938, U.S. Patent 2112712; C.A. 32, 3915 (1938).
12. KOLLER, R.: Dtsch.tierärztl.Wschr., Beilage Fortpflanzung, Zuchthygiene u.Haustierbesamung, S.32 (1955).
13. BENNETTS, H.W., UNDERWOOD, E.J. und F.L.SHIER: Austr. Vet.J. 22 (1946), 2 zit. n. BARTLETT, S.,FOLLEY,S.J. CURNOW, D.H. und S.A.SIMPSON, Nature 162 (1948), 845
14. CURNOW, D.H., ROBINSON, T.J. und E.J.UNDERWOOD: Austr.J. exp. Biol.a.Med.Sci. 26 (1948), 171

15. BENNETTS, H.W. und E.J.UNDERWOOD: Austr.J.exp.Biol. Med.Sci. 29 (1951), 449

16. CURNOW, D.H. und H.W.BENNETTS: 6th International Grassland Congr. 1952, zit.nach KOLLER, R.: Dtsch.tierärztl.Wschr., Beilage Fortpflanzung, Zuchhygiene u.Haustierbesamung, S.32 (1955).

17. LAQUER, W.: Aus dem pharmakotherapeutischen Laboratorium der Universität Leiden 1936

18. EAST, J., UNDERWOOD, E.J. und H.W.BENNETTS: Austr. J. exp. Biol.Med. Sci. 27 (1949), 105

19. ROBINSON, T.J.: Austr.J.exp. Biol.Med.Sci. 27 (1949), 297

20. BECK, A.B. und A.W. BRADEN: Austr.J.exp.Biol. Med.Sci. 29 (1951), 273

21. LEGG, S.P., CURNOW, D.H. und S.A.SIMPSON: Biochem.J. exp.Biol. Med.Sci. 29 (1951), 273

22. BRADBURY, R.B. und D.E,WHITE: Vitamines and Hormones, Vol. XII, 207 (1954) zit.nach BIGGERS, J.D. und D.H.CURNOW: Biochem.J. 58 (1954), 278

23. BIGGERS, J.D. und D.H.CURNOW: Biochem. J. 58 (1954), 278

24. UNDERWOOD, E.J., SHIER, F.L. und J.E.PETERSON: Austr. Vet.J. 29 (1953), 206

25. EMMENS, C.W.: J.Endocrinol. 2 (1941), 444

26. EMMENS, C.W.: J.Endocrinol. 3 (1942), 174

27. CHENG, E., YODER, L., STORY, C.D. und W.BURROUGHS: Science 120 (1954), 575

28. BICKOFF, E.M., BOOTH, A.N., LYMAN, R.L., LIVINGSTON, A.L. und C.R.THOMPSON: Science 126 (1957), 969

29. BICKOFF, E.M., LYMAN, R.L., LIVINGSTON, A.L. und A.N. BOOTH: J.Amer.Chem.Soc. 80 (1958), 3969

30. GRISEBACH, H. und W.BARZ: Z.Naturforsch.18 (1963),466

31. BARTLETT, S., FOLLEY, S.J., ROWLAND, S.J., BURROW, D.H. und S.A.SIMPSON: Nature 162 (1951), 845

32. DOHAN, F.C., RICHARDSON, E.M., STRIBLEY, R.C. und P. GYORGY: J.Amer.Vet.Med.Ass. 118 (1951), 323

33. CHENG, E., STORY, C.D., PAYNE, C., YODER, L. und W. BURROUGHS: J.Anim.Sci. 12 (1953), 507 zit.nach KÖLLER, R.: Dtsch.tierärztl.Wschr., Beilage Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung, 32(1955)

34. CHENG, E., STORY, C.D., YODER, L., HALE, L. und W.H. BURROUGHS: Science 118 (1953), 164

35. SCHOOP, G.: Dtsch.tierärztl. Wschr. Beilage Fortpflanzung und Besamung der Haustiere 2 (1952), 73

36. SCHOOP, G., KLETTE, H. und G.RENNER: Dtsch. tierärztl. Wschr., Beilage Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 62 (1955), 103

37. SCHOOP, G. und H.KLETTE: Kongreßbericht II.Internationaler Kongreß Physiol.Pathol.d.Fortpflanzung und künstl.Besamung, Kopenhagen 1952 zit. nach SCHOOP, G. und H.KLETTE: Dtsch.tierärztl.Wschr. 62 (1955), 461

38. SCHOOP, G. und H.KLETTE: Dtsch.tierärztl.Wschr. 62 (1955), 461

39. SCHOOP, G. und H.KLETTE: Dtsch.tierärztl.Wschr. Beilage Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 5, (1955), 37

40. SCHOOP, G.: Vortrag III. Internationaler Kongreß für Fortpflanzung der Tiere, Cambridge 1956, Mh. Tierheilkunde 9 (1957), 1

41. ROWLAND, S.J.: J.Dairy Res. 13,(1944), 261, zit. nach BARTLETT, S., FOLLEY, S.J., ROWLAND, S.J., CURNOW, D.H. und S.A.SIMPSON: Nature 162 (1948), 845

42. BARTLETT, S. und S.J.ROWLAND: nicht veröffentlicht; zit. nach BARTLETT, S., FOLLEY, S.J., ROWLAND, S.J., CURNOW, D.H. und S.A.SIMPSON: Nature 162 (1948), 845

43. FOLLEY, S.J.: Biochem. J. 30 (1936), 2262

44. FOLLEY, S.J., SCOTT-WATSON, H.M. und A.C.BOTTOMLEY: J.Dairy Res. 12 (1941), 1

45. POPE, G.S., ELCOATE, P.V., SIMPSON, S.A. und D.G. ANDREWS: Chem. Ind., S.1092 1953

46. KULCSAR-GERGELY, J.: Pharmazie 15 (1960), 199

47. PETERSON, D.H.: IV. Internationaler Kongreß für Biochemie, Bd. IV, S.83, Wien 1958

48. PIETERSE, P.J.S. und F.N.ANDREWS: J.Dairy Sci. 39 (1956), 81

49. LEVIN, E., BURNS, J.F. und V.K.COLLINS: Endocrinol. 49 (1951), 289

50. SCHOOP, G., KLETTE, H. und H.NEUMANN: Z.Seifen,Öle, Fette, Wachse 13 (1958), 391

51. GRANDEL, F.: Hippokrates (Z.prakt.Heilkunde), 1960

52. VAGUE, J., GARRIGUES, J.C., BERTHET, J. und G. FAVIER: Ann.d'Endocrinol. 18 (1957), 745

53. COSTELLO, C.H. und E.V.LYNN: J.Amer.Pharm.Ass.Scient. Ed. 39 (1950), 177

54. HÖLLER, H., HÜCKELT H. und W.SCHNEIDER: Scientia pharmaceutica 28 (1960), 33

55. FEURT, S.D. und L.E.FOX: J.Amer.Pharmac.Ass. Scientif. Ed. 41 (1952), 453

56. ZONDEK, B.: Lancet 10 (1936), 10

57. KENDALL, K.A., SALISBURY, G.W. und N.L. van DEMARK: J.Nutrit. 42 (1950), 487

58. WALZ, E.: Ann.Chem. 489 (1931), 118

59. CARTER, M.W., SMART, W.W.G. und G.MATRONE: Proc.Soc. exp.Biol. 84 (1953), 506

60. KOCH, W. und G.HEIM: Brauwiss. 8 (1953), 132

61. KOCH, W. und G.HEIM: Münch.med.Wschr. 95 (1953),845

62. HEILMANN, P.: Brauwiss. 11 (1957), 277

63. ZENISEK, A. und J.BEDNAR: Cosmétologie 22 (1959), 21

64. SCHÄFER, F.: Diss. d.Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät d.Universität des Saarlandes 1964.

65. ALLEN,E. und E.O.DOISY: J.Amer.med.Assoc. 81 (1923), 819

66. AMMON, R. und W.DIRSCHERL: Fermente, Hormone, Vitamine Bd. 2, Stuttgart 1960

67. FELLNER,H.: Arch.Physiol.189 (1921), 199 und Münch. med.Wschr. 72 (1925), 1582

68. SCHRÖDER und F.GÖRBIG: Z.Geburtsh.Gynäk. 83 (1921), 764

69. BÜLBRING und BURN: J.Physiol. (Brit.) 85 (1935), 320

70. TOBIAS, A.: Pharmazie 4 (1949), 511

71. HOHLWEG und FISCHL: Klin. Wschr. 12 (1933), 1139

L e b e n s l a u f

Ich, Marie Anna R o t h h o l z, Tochter des damaligen Landgerichtsrates Dr. Walter Rothholz und seiner Ehefrau Else Marie, geb. Bölling, wurde am 25. Oktober 1937 in Neuilly/Seine geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Norwegen und in der Schweiz, anschließend die Hauptschule in Österreich. In München legte ich nach 7 Oberschuljahren 1958 das Abiturientenexamen ab.

Mit dem Wintersemester 1958/59 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich bis zur ärztlichen Prüfung am 24.2.1965 blieb.

Danach war ich 3 1/2 Monate in einer Landpraxis und seit dem 1. Oktober 1965 bin ich am Kreiskrankenhaus Wertingen tätig.